

M/ 10512 / 2879

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**"LOS VASOS LINFÁTICOS INTRATUMORALES Y LA EXPRESIÓN
DEL VEGF-C
SON FACTORES PREDICTIVOS DE RECIDIVA GANGLIONAR EN EL
CARCINOMA EPIDERMÓIDE LARINGOFARÍNGEO T1-T4 N0"**

Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Doctorando: Adolfo Hinojar Gutiérrez

Reg. FM 26055

Tutor: Prof. Dr. D. José Cordero Ampuero.

Director: Prof. Dr. D. Carlos Gamallo Amat



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acuerda calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de ~~sobresaliente~~

Madrid,

~~24. julio 1906~~ *24. julio 1906* por unanimidad

Muñoz

H. Gutiérrez

Diego López

San Martín

S.





Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía Patológica

D. JOSÉ CORDERO AMPUERO, PROFESOR TITULAR Y TUTOR DEL
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE MADRID

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por D. ADOLFO HINOJAR GUTIÉRREZ, titulado **LOS
VASOS LINFÁTICOS INTRATUMORALES Y LA EXPRESIÓN DE VEGF-C SON
FACTORES PREDICTIVOS DE RECIDIVA GANGLIONAR EN EL CARCINOMA
EPIDERMOIDE LARINGOFARÍNGEO T1-T4 N0** para optar al grado de Doctor en
Medicina cumple plenamente los requisitos exigidos para ser presentado como Tesis
Doctoral.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Madrid, a 18 de mayo de 2006.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Cordero', is written over a horizontal line.

Fdo. José Cordero Ampuero




Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía Patológica

D. CARLOS GAMALLO AMAT, PROFESOR TITULAR DE ANATOMÍA PATOLÓGICA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CERTIFICO:

Que D. ADOLFO HINOJAR GUTIÉRREZ ha realizado bajo mi dirección el trabajo
titulado **LOS VASOS LINFÁTICOS INTRATUMORALES Y LA EXPRESIÓN DE
VEGF-C SON FACTORES PREDICTIVOS DE RECIDIVA GANGLIONAR EN EL
CARCINOMA EPIDERMÓIDE LARINGOFARÍNGEO T1-T4 N0** y considera que este
trabajo cumple plenamente los requisitos exigidos para ser presentado como Tesis
Doctoral.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Madrid, a 17 de mayo de 2006.



Fdo. Carlos Gamallo Amat

*A mi mujer Marisol, por su paciencia, ayuda y
constante apoyo; a mis padres por su continuo
ejemplo, dedicación y buen consejo; a mis suegros
por su bondad, generosidad y optimismo y a Clara,
mi primera hija, que acaba de llegar a este mundo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Carlos Gamallo Amat por permitirme participar con él en este proyecto, por su dedicación, estímulo y apoyo, por su amistad y paciencia en los buenos y malos momentos.

A la Doctora María Encarnación Fernández Contreras por su ayuda, paciencia, buen humor y también por su amistad.

A Lourdes Osuna por su compañerismo, su generosidad y buen hacer en el manejo de las muestras de los pacientes y el desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas, sin los que este trabajo no hubiera sido posible.

A Gloria, nuestra bibliotecaria, por su profesionalidad y dedicación en la búsqueda de las reseñas bibliográficas, incluso las más raras.

A la Fundación Biomédica del Hospital de la Princesa por todo el tiempo que hemos compartido en la realización de este trabajo.

Al personal del Archivo de historias clínicas del Hospital de la Princesa, por su impagable ayuda en la búsqueda de pacientes.

A los pacientes afectados por esta terrible enfermedad y a sus familiares, para que este trabajo pueda en algo aliviar su sufrimiento.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. RESUMEN	Pg. 1
2. INTRODUCCIÓN	Pg. 4
2.1 EPIDEMIOLOGÍA	Pg. 5
2.2 FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CARCINOMA LARINGOFARÍNGEO	Pg. 8
2.2.1 Factores pronósticos clínicos en el carcinoma faríngeo.	Pg. 9
2.2.2 Factores pronósticos anatomopatológicos en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo.	Pg. 10
2.2.2.1 Valoración morfológica convencional	Pg. 10
A. Factores propios del tumor	Pg. 11
A.1 Grado del tumor	Pg. 11
A.2 Bordes quirúrgicos	Pg. 12
A.3 Frente de invasión tumoral	Pg. 12
A.4 Invasión vascular	Pg. 13
A.5 Invasión perineural	Pg. 13
A.6 Ganglios linfáticos	Pg. 13
B. Factores propios del huésped	Pg. 15
B.1 Interfase huésped-tumor	Pg. 15
B.2 Ganglios linfáticos	Pg. 15
2.2.2.2. Valoración mediante técnicas auxiliares	Pg. 16
A. Ploidía de ADN	Pg. 16
B. Actividad proliferativa	Pg. 17
C. Oncogenes y genes supresores	Pg. 18

D. Otros	Pg. 18
3. HIPÓTESIS	Pg. 20
3.1 DESARROLLO DE LA HIPÓTESIS	Pg. 21
4. OBJETIVOS	Pg. 22
5. MATERIAL Y MÉTODOS	Pg. 24
5.1 MATERIAL DE LA MUESTRA DE PACIENTES	Pg. 25
5.2 ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER	
LARINGOFARÍNGEO	Pg. 27
5.3 CLASIFICACIÓN DEL GRADO HISTOLÓGICO	Pg. 33
5.4 MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	Pg. 34
5.4.1 Valoración de la presencia de vasos linfáticos iniciales intratumorales mediante la expresión del antígeno PA2.26	Pg. 34
5.4.2 Evaluación de la linfangiogénesis intratumoral (LIT)	Pg. 35
5.4.3 Valoración de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial - C (VEGF-C)	Pg. 37
5.4.4 Evaluación de la expresión del VEGF-C	Pg. 37
5.5 MÉTODOS ESTADÍSTICOS	Pg. 38
6. RESULTADOS	Pg. 40
6.1 GRUPO N(0). AUSENCIA DE METÁSTASIS GANGLIONARES	Pg. 41
6.2 GRUPO N(+). PRESENCIA DE METÁSTASIS GANGLIONARES	Pg. 47
7. DISCUSIÓN	Pg. 53
7.1 ORIGEN Y FORMACIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO	Pg. 54

7.2 FACTORES DE CRECIMIENTO LINFÁTICO	Pg. 57
A. VEGF-C y VEGF-D	Pg. 57
B. Angiopoyetinas y receptores Tie	Pg. 60
C. Neuropilina-2	Pg. 61
D. Prox-1	Pg. 61
7.3 MARCADORES DEL ENDOTELIO LINFÁTICO	Pg. 62
A. VEGFR-3	Pg. 63
B. Podoplanina	Pg. 63
C. Prox-1	Pg. 64
D. LYVE-1	Pg. 64
E. PA2.26	Pg. 65
7.4 ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA DEL SISTEMA LINFÁTICO EN EL ADULTO	Pg. 66
7.5 FUNCIONES DEL SISTEMA LINFÁTICO	Pg. 69
7.6 IMPLICACIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO EN EL CÁNCER	Pg. 71
7.7 PAPEL DEL VEGF-C EN LA BIOLOGÍA TUMORAL	Pg. 73
7.8 LINFANGIOGÉNESIS TUMORAL	Pg. 77
8. CONCLUSIONES	Pg. 82
9. BIBLIOGRAFÍA	Pg. 84

RESUMEN

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La evidencia clinicopatológica demuestra que el sistema linfático es la vía principal de diseminación del carcinoma laringofaríngeo. El descubrimiento reciente de marcadores específicos del endotelio linfático y de los factores de crecimiento que lo estimulan, han centrado la atención en el proceso de linfangiogénesis tumoral y su relación con las metástasis ganglionares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo en 130 pacientes con carcinoma epidermoide laringofaríngeo sin metástasis ganglionares (N0) o con ellas (N+), de distintos tamaños (T1-T4), grado histológico variable y diferente localización (supraglótico, glótico e hipofaríngeo). A través de métodos inmunohistoquímicos se pusieron de manifiesto la presencia de vasos linfáticos intratumorales (VLI), mediante la expresión del antígeno PA 2.26, y la expresión tumoral del factor de crecimiento endotelial vascular-C (VEGF-C). Se definieron los criterios de linfangiogénesis intratumoral (LIT) de alto y bajo grado. Finalmente, se analizó estadísticamente la relación de estos factores con la recidiva y otras variables clinicopatológicas y con la supervivencia global y libre de enfermedad.

RESULTADOS

En el grupo de pacientes N0, la presencia de linfangiogénesis intratumoral de bajo grado y la expresión del VEGF-C incrementaron en 30.3 y 16.2 veces, respectivamente, ($P=0.005$ y 0.032), las probabilidades de tener una recidiva ganglionar cervical y acortaron en 16.2 y 8.44 veces ($P = 0.009$ y 0.045) el tiempo libre de enfermedad en el análisis multivariante. En los pacientes con adenopatías metastásicas (N+), no se halló

ninguna relación entre el la presencia de linfangiogenesis y o la expresión del VEGF-C y los distintos aspectos de la enfermedad analizados.

CONCLUSIONES

En estadios más precoces (N0) de la progresión tumoral del carcinoma epidermoide laringofaríngeo, la presencia de LIT de bajo grado y la expresión del VEGF-C son factores predictivos independientes de recidiva ganglionar cervical. En estadios avanzados de la enfermedad (N+), ni la presencia de LIT ni la expresión del VEGF-C influyen en la enfermedad, sino que son las propias adenopatías metastásicas las que constituyen el único factor pronóstico.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la existencia de una proliferación anormal de células. Lo que le confiere la característica de malignidad a esta proliferación celular es su capacidad para invadir órganos y tejidos y diseminarse a distancia. El carcinoma epidermoide de laringofaringe es una enfermedad con gran predominio en el sexo masculino y en relación con la exposición a carcinógenos, fundamentalmente al consumo de tabaco (94% de los pacientes diagnosticados de cáncer de laringe) y, en menor medida de alcohol. El carcinoma laringofaríngeo se encuentra claramente relacionado no sólo con el hábito tabáquico sino con la cantidad y tipo de tabaco consumido. Por lo general este tumor se diagnostica relativamente temprano debido a las alteraciones que provoca en las funciones fonatoria, deglutoria y respiratoria. Así, el 60% de los pacientes en el momento del diagnóstico tienen una enfermedad localizada en la laringofaringe. En el 25% la enfermedad es local y metastásica a los ganglios linfáticos regionales y sólo el 15% de los pacientes tienen una enfermedad avanzada, metástasis a distancia, o ambas, en el momento del diagnóstico.

El cáncer de laringe es uno de los cánceres más frecuentes en Europa, con unos 52.000 nuevos casos anuales, el 90% de los cuales aparecen en hombres. La tasa de incidencia anual para hombres en el sur y el norte de Europa oscila entre un 18 por 100.000 y un 6 por 100.000 respectivamente. Para las mujeres la tasa de incidencia anual no es mayor de un 1,5 por 100.000 (Ferlay J, et al. 2001).

En el sur de Europa el carcinoma supraglótico es más frecuente que el glótico, mientras que ocurre lo contrario en el noroeste europeo (European Network of Cancer Registries, 1997).

Entre la población de los hombres europeos, la incidencia del cáncer de laringe aumenta con la edad. La mayoría de los casos se diagnostican a partir de los 65 o más años (alrededor de un 45% del total). Se observa un pico de máxima incidencia entre la sexta y la séptima décadas de la vida con unos 50 nuevos casos anuales por 100.000 (Ferlay J, et al. 2001).

La prevalencia de cáncer de laringe se conoce para Italia (Micheli A, et al. 1999). En 1992, fue de 142 por 100.000 (271 en hombres y 22 en mujeres). La mayor parte de ellos (76%) fueron pacientes de larga supervivencia (cinco o más años con el diagnóstico hasta el momento de la inclusión). La mayor prevalencia del cáncer de laringe se observó en el noroeste de Italia con un 2% aproximadamente.

En Europa, la supervivencia relativa del cáncer de laringe en adultos durante el periodo 1985-1989 fue del 62% a los cinco años (Berrino F, et al. 1999). Se ha observado una mejoría en el pronóstico de la enfermedad. En 1978 la supervivencia a cinco años de los pacientes con cáncer de laringe fue del 58% frente al 63% del año 1989 (Esteve J, et al. 1999).

El estadio determina de forma importante la supervivencia, como se confirmó en el estudio de supervivencia de pacientes con cáncer realizado en Finlandia: la supervivencia a los cinco años fue del 75, 27 y 13% en varones y del 69, 31 y 15% en mujeres, en los casos de cáncer localizado, metástasis regionales y metástasis a distancia respectivamente (Dickman PW, et al. 1999).

Existe un continuo descenso en la curva de supervivencia de más de 10 años tras el diagnóstico. Esto es debido principalmente a la aparición de otras enfermedades que

tienen relación con el tabaquismo y no al cáncer de laringe en sí mismo. La aparición de tumores primarios en otras localizaciones es frecuente y es un determinante fundamental para el pronóstico y un gran reto para el tratamiento (Berrino F. et al. 1998).

En España el cáncer es, en términos absolutos, la primera causa de muerte con 91.623 muertes en el año 2000, de las que 57.382 correspondieron a hombres y 34.241, a mujeres, lo que supuso el 25,6% de todas las defunciones (López-Abente G. et al. 2003(a)). En 1999, el cáncer pasaba a ser la primera causa de muerte en hombres para el conjunto de España y para las Comunidades Autónomas de Aragón, Asturias, Cantabria, Castilla-León, Galicia, Madrid, Navarra, País Vasco y la Rioja. En mujeres, aunque aún se sitúa en segundo lugar tras las enfermedades cardiovasculares, el cáncer presenta una tasa truncada ajustada (para los grupos de edad de 35-64 años) tres veces mayor que aquéllas y provoca el mayor número de años potenciales de vida perdidos (Llácer A, 2002). El envejecimiento de la población, el incremento de la incidencia de muchos tumores malignos y la mejor supervivencia de los enfermos de cáncer debido a los avances diagnósticos y terapéuticos, han supuesto un aumento significativo de la prevalencia de estos enfermos. Esta situación pone a prueba la red de asistencia oncológica y marca la creciente importancia de este tipo de enfermedades como problema de salud pública en nuestro país. Se estima que cada año se producen 150.000 casos nuevos de cáncer en España, 90.000 en hombres y 60.000 en mujeres. Las localizaciones tumorales más frecuentes (excluyendo los tumores de piel no-melanoma) son el cáncer de pulmón, los cánceres colorrectales, el cáncer de próstata y el de vejiga en hombres y, en mujeres, el cáncer de mama, los tumores colorrectales, el cáncer de útero y los tumores de ovario y de estómago. En la estimación de la incidencia anual de cáncer en España, en el período 1997-2000, el cáncer de laringe ocupó el noveno lugar entre todos los tumores exceptuando los de piel no melanoma, con un total de 4557 casos

para ambos sexos. Asimismo, el carcinoma de laringe ocupó en España en el año 2000 la novena posición en número de defunciones por cáncer (1 768 defunciones) en hombres, no estando reflejadas las de las mujeres. (López Ahente G, et al 2003(b))

Mientras que nuestro país ocupa un lugar intermedio, en comparación con otros países de la Unión Europea (UE), en la incidencia del conjunto de los tumores malignos, el cáncer de laringe en hombres, presenta las tasas de incidencia y mortalidad más altas de la UE. En 1.998 ocupó el primer puesto entre las tasas de incidencia de este tipo de cáncer en la UE, con una Tasa Ajustada (TA) por 100.000 (población estándar europea) de 17,31, frente a la media de la UE de 10,79. Por otro lado, la tasa de mortalidad en España por cáncer de laringe en hombres para el mismo año, también ocupó el primer lugar entre las tasas de mortalidad por carcinoma de laringe de la UE, con una TA por 100.000 (población estándar europea) de 8,15, frente a los 4,68 de la media de la UE. Por el contrario, las mujeres españolas en 1.998, tuvieron la tasa de incidencia por cáncer de laringe más baja de la UE, con una TA por 100.000 (población estándar europea) de 0,42, frente a la media de la UE de 0,88, y la segunda TA de mortalidad más baja de la UE, sólo por detrás de Finlandia, con un 0,20, frente al 0,34 de la media de la UE. (Ferlay J, et al. 1999).

2.2 FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CARCINOMA LARÍNGOFARÍNGEO

Aunque la clasificación clínica (TNM) es útil para valorar el pronóstico de grupos de pacientes con carcinoma epidermoide laringofaríngeo, no puede anticipar la evolución clínica de cada caso (Ferlito A, et al. 1995; Reid AP, et al. 1991). Por eso, se han buscado indicadores pronósticos adicionales para intentar predecir mejor la evolución de cada paciente y mejorar al máximo su atención. La identificación de factores tumorales

que nos ayuden a discriminar de forma fiable las formas más agresivas de la enfermedad frente a las menos agresivas, sería de una gran utilidad para emplear con mayor precisión tratamientos complementarios o tratamientos más agresivos cuando sea necesario y evitar morbilidades, mayores estancias y costes cuando sea posible.

2.2.1 Factores pronósticos clínicos en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo

La mayor parte de los datos concernientes a los factores pronósticos clínicos provienen de pacientes tratados mediante radioterapia. Se ha demostrado que consumo de alcohol se correlaciona negativamente con la supervivencia (Pradier R, et al. 1993). La afectación ganglionar es el factor pronóstico más importante, tanto en las series quirúrgicas como en las radioterapéuticas. La presencia de afectación de ganglios linfáticos reduce a la mitad las tasas de supervivencia (Stell PM, et al. 1990). El pronóstico del cáncer de laringe varía considerablemente en función del lugar anatómico de origen del tumor, lo que influye en la aparición temprana de síntomas y, por tanto, en el estadio al diagnóstico y en la posibilidad de una resección quirúrgica radical. Los tumores glóticos tienen un pronóstico más favorable que los supraglóticos o los subglóticos (Pera E, et al. 1986). El volumen del tumor primario se correlaciona estrechamente con la tasa de control local que se obtiene con la radioterapia. Los tamaños o niveles tumorales definidos por el T (las categorías de T) según la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) son, generalmente, bastante eficientes para predecir la probabilidad de control local. La variable clínica acerca de la extensión local más relevante es la movilidad cordal (Lee WR, et al. 1993; Flein DA, et al. 1993). Se ha visto que la traqueotomía previa reduce la supervivencia, probablemente porque

incrementa el riesgo de recurrencia en el estoma traqueal (Manni JJ, et al. 1992). La respuesta a la quimioterapia es un factor predictivo importante de respuesta posterior a la radioterapia, como se ha demostrado por los resultados de los ensayos de preservación de órganos. Un nivel de hemoglobina mayor de 12,5g/dl. durante la radioterapia se ha descrito como un factor predictivo de la respuesta tumoral en el carcinoma de laringe avanzado y del resultado tras el tratamiento quirúrgico de los pacientes con carcinoma glótico (Nguyen-Tan PF, et al. 2001; Lutterbach J et al. 2000).

2.2.2 Factores pronósticos anatomopatológicos en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo

Los diferentes parámetros anatomopatológicos pueden dividirse según hayan sido valorados mediante morfología convencional y los que hayan requerido técnicas auxiliares.

2.2.2.1. Valoración morfológica convencional

El pronóstico de un paciente refleja la interacción entre la biología del tumor, la situación subyacente, las defensas del huésped y los resultados terapéuticos (Stell PM, 1990). Los anatomatólogos han intentado, con éxito limitado, predecir la agresión tumoral y la eficacia de las defensas naturales del huésped basándose en la morfología convencional.

A. Factores propios del tumor

A-1 Grado del tumor

El valor pronóstico del grado del tumor en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo es limitado debido a la carencia de un sistema de gradación aceptado universalmente, la subjetividad inherente, la modesta reproductibilidad de la gradación histológica y la posible heterogeneidad del grado dentro de un mismo tumor (Giraem N, et al. 1980). En numerosos estudios se ha visto que el grado tumoral predecía la presencia de metástasis ganglionares (McGravran MH, et al. 1961; Bennett SH, et al. 1971; Lund C, et al. 1979; Stell PM, 1990; Ghouri AF, et al. 1994; Resnick JM, et al. 1995), la recurrencia (Bennett SH, et al. 1971; Russo A, et al. 1995; Welkoborsky HJ, et al. 1995) y la supervivencia global (Bennett, SH, et al. 1971; Lund C, et al. 1979; Pera E, et al. 1986; Stell PM, 1990; Hirabayashi H, et al. 1991; Wiernik G, et al. 1991; Welkoborsky HJ, et al. 1995). Sin embargo, la utilidad pronóstica independiente del grado del tumor, sólo se ha establecido en unas pocas publicaciones (Pera E, et al. 1986; Wiernik G, et al. 1991; Resnick JM, et al. 1995; Russo A, et al. 1995; Welkoborsky HJ, et al. 1995). Por el contrario, muchos autores no han logrado demostrar de forma concluyente una correlación independiente entre el grado del tumor, la recurrencia y la supervivencia global (Eiband JD, et al. 1989; Foote RL, et al. 1989; Goldsmith MM, et al. 1992; Kowalsky LP, et al. 1992; Manni JJ, et al. 1992; Munck-Wikland E, et al. 1993; Patt BS, et al. 1993; Pradier R, et al. 1993; Tennvall J, et al. 1993).

El grado del tumor puede estar relacionado con el pronóstico, sobre todo en los extremos del espectro (es decir, carcinoma epidermoide mal diferenciado en comparación con carcinoma epidermoide bien diferenciado (Kowalsky LP, et al. 1995). No obstante, el

grado del tumor como factor pronóstico independiente en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo aún suscita controversia.

A-2 Bordes quirúrgicos

La afectación de los bordes quirúrgicos por el tumor puede ser un importante indicador independiente de mal pronóstico en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo (Kowalsky LP, et al. 1991; Manni JJ, et al. 1992). En una serie de casos, el estado de los bordes de resección fue el factor anatomopatológico de mayor importancia para la supervivencia duplicándose el riesgo de recurrencia o muerte en los que tenían bordes positivos (Kowalsky LP, et al. 1991). Otro estudio demostró que el 30% de las piezas de laringectomía examinados mediante cortes seriados de todo el órgano tenían bordes positivos. Se observó recurrencia local en el 48% de los casos con bordes afectos, y no la hubo cuando el tumor estaba a más de 2mm. del borde (Lam KH, et al. 1988). Del mismo modo, los bordes positivos en laringectomías parciales verticales se identificaron como factores predictivos independiente supervivencia global y libre de enfermedad (Soo KC, et al. 1988). Paradójicamente, el mismo grupo encontró que los bordes afectados en las laringectomías parciales supraglóticas no tienen un importante impacto en la recurrencia o la supervivencia (Soo KC, et al. 1988).

A-3 Frente de invasión tumoral

Se ha dado a entender que el carcinoma epidermoide laringofaríngeo con bordes infiltrantes tiene peor pronóstico que el que tiene bordes que producen desplazamiento, aunque esto no se ha demostrado de manera general (Mcgravran MH, et al. 1961; Pera, E,

Hirabayashi H, et al. 1991; Reid AP, et al. 1991;). Muchos estudios corroboran la importancia de la afectación de los ganglios linfáticos como factor predictivo independiente de recurrencia, supervivencia y pronóstico general (Pera F, et al. 1986; Eiband JD, et al. 1989; Foote RL, et al. 1989; Manni JJ, et al. 1992; Patt BS, et al. 1993; Pradier R, et al. 1993). La afectación ganglionar es todavía el mejor factor predictivo de la evolución clínica (Schuller DE, et al. 1980; Snow GB, et al. 1982; Decker JW, et al. 1986; Stell PM, 1990; Manni JJ, et al. 1992; Barona de Guzmán R, et al. 1993(a)).

En el contexto de las metástasis ganglionares conocidas, hay descritos otros factores que pueden influir en el pronóstico, como son la diseminación ganglionar extracapsular y el número y localización de los ganglios linfáticos cervicales afectados. La diseminación extracapsular del tumor en las metástasis ganglionares se considera un indicador pronóstico adverso que se relaciona de forma importante con la recurrencia y la disminución de la supervivencia (Bennett SH, et al. 1971; Snow GB, et al. 1982; Snyderman NL, et al. 1985; Stell PM, 1990; Hirabayashi H, et al. 1991; Barona de Guzmán R, et al. 1993(a); Barona de Guzmán R, et al. 1993(b); Patt BS, et al. 1993; Kowalsky LP, et al. 1995;). El número de ganglios metastásicos también puede ser útil como indicador pronóstico (Snow GB, et al. 1982; Carter RL, et al. 1987; Barona de Guzmán R, et al. 1993(a); Welkoborsky HJ, et al. 1995). Algunos autores refieren que las metástasis en más de dos ganglios linfáticos tienen peor pronóstico (Kleinsasser O, 1992; Barona de Guzmán R, et al. 1993(b);), mientras que otros indican que no hay relación entre el número de ganglios linfáticos afectos y el pronóstico (Hirabayashi H, et al. 1991; Manni JJ, et al. 1992). La localización de los ganglios linfáticos positivos en el cuello también puede influir en el pronóstico del carcinoma epidermoide laringofaríngeo (Schuller DE, et al. 1980; Kleinsasser O, 1992;).

B. Factores propios del huésped

B-1 Interfase huésped- tumor

El tipo y grado de la reacción inflamatoria del huésped frente al tumor, pueden repercutir en el pronóstico. La eosinofilia intensa de tejidos relacionada con el tumor (TATE), la infiltración peritumoral con células de Langerhans y una inflamación linfoide abundante, se han considerado como indicadores de buen pronóstico (Gallo O, et al. 1991; Goldsmith MM, et al. 1992; Thompson AC, et al. 1994). Sin embargo, algunos autores ponen en duda la importancia pronóstica del TATE en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo (Sassler AM, et al. 1995).

B-2 Ganglios linfáticos

El aspecto histológico de los ganglios linfáticos cervicales benignos puede reflejar la reacción del huésped e influir en el pronóstico. La presencia de ganglios linfáticos que muestran cambios reactivos como histiocitosis sinusal, hiperplasia folicular linfoide o numerosas células plasmáticas se relacionan con menos metástasis y mejor supervivencia (Bennett SH, et al. 1971; Berlinger NT, et al. 1976; Patt BS et al. 1993). Del mismo modo, la identificación de depleción linfoide en ganglios linfáticos cervicales se ha vinculado con mal pronóstico (Berlinger NT, et al. 1976; Galioto GB, et al. 1987). Sin embargo, otros investigadores no pudieron establecer una relación entre el aspecto histológico de los ganglios linfáticos no afectados y las metástasis ganglionares (Carter RL, et al. 1987) (11).



En resumen, debido a la ausencia de criterios establecidos, la evaluación de este grupo de parámetros histológicos es muy subjetiva y su reproducibilidad es pobre

El estado de los ganglios linfáticos, incluida la diseminación extracapsular, es el único dato morfológico convencional que ha demostrado de manera convincente que tiene importancia en el pronóstico del carcinoma laringofaríngeo. Otros rasgos histológicos, en particular el grado del tumor y los bordes de resección, también pueden relacionarse con el pronóstico.

2.2.2.2. Valoración mediante técnicas auxiliares

Estas técnicas proporcionan información sobre el tumor, que no puede deducirse del examen histopatológico habitual. Son más cuantitativas y reproducibles que la morfología convencional.

A. Ploidía de ADN

Los tumores aneuploides son aquellos con un contenido anormal de ADN. En muchos tipos de neoplasias los tumores aneuploides son más agresivos que la contrapartida diploide. Habitualmente, la ploidía del ADN se averigua mediante citometría de flujo de ADN o mediante análisis de imagen.

La relación entre la ploidía de ADN, establecida mediante citometría de flujo de ADN y el pronóstico en el cáncer de cabeza y cuello y en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo presenta resultados contradictorios. Varios autores refieren que la aneuploidía conlleva un riesgo importante de recurrencia local en los carcinomas glóticos T1 tratados con radioterapia (Westerbeek HA, et al. 1993). Para otros, la

probabilidad de recurrencia tras tratamiento con radioterapia en carcinomas glóticos T1-T2 es mayor cuando estos tumores son diploides (Toffoli G, et al. 1995). En tumores en estadios más avanzados, la aneuploidía no resultó un factor significativo de recurrencia local o de supervivencia global (Russo A, et al. 1995), mientras otros trabajos consideran que, en pacientes N0, la aneuploidía es un factor predictivo independiente de metástasis ganglionares o de supervivencia global (Resnick JM, et al. 1995). Algunos, incluso refieren que el carcinoma epidermoide laringofaríngeo aneuploide se relaciona con un pronóstico más favorable (Goldsmith MM, et al. 1986).

El aumento del ADN tumoral detectado mediante análisis de imagen en el carcinoma laríngeo se ha relacionado con las metástasis ganglionares y la recurrencia tumoral (Wolf GT, et al. 1994).

B. Actividad proliferativa

La actividad proliferativa de un tumor puede reflejar su potencial biológico y sensibilidad al tratamiento.

La utilidad de la fracción de fase S para predecir el pronóstico y la respuesta al tratamiento en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo y en el cáncer de cabeza y cuello ha sido poco concluyente. Una fracción baja de la fase S se ha relacionado con la recurrencia local por algunos autores (Tennvall J, et al. 1993), mientras que otros refieren que una fracción elevada de la fase S es un factor predictivo independiente de recaída y muerte (Russo A, et al. 1995).

Algunos estudios han demostrado que existe una relación entre la expresión de Ki67 en el carcinoma epidermoide laríngeo y las recurrencias o la aparición de metástasis ganglionares (Welkoborsky HJ, et al 1995; Franchi A, et al. 1996). Otros no encontraron

ninguna asociación entre el Ki67 y el tiempo libre de enfermedad, la supervivencia global o las metástasis ganglionares (Roland NJ, et al. 1994; Resnick JM, et al. 1995)

C. Oncogenes y Genes Supresores

Los principales oncogenes y genes supresores que se han relacionado con el carcinoma de laringe como el Ras, Herb-2, p53 y otros, carecen, en la mayoría de los estudios de implicaciones pronósticas en el cáncer laringofaríngeo (Miyaguchi, et al. 1991; Maurizi M, et al. 1992; Scambia G, et al. 1994; Nadal A, et al 1995; Salam MA, et al. 1995)

D. Otros

La relación entre la expresión de la cadherina E y la presencia de metástasis ganglionares se ha estudiado por diversos autores con diferentes resultados. Para algunos la disminución en la expresión de la cadherina-E se relaciona con un aumento de las metástasis ganglionares en el cáncer de laringe (Franchi A, et al. 1996), mientras que otros no encontraron ninguna relación entre el nivel de expresión de la cadherina-E y la presencia de adenopatías metastásicas en un grupo de 50 carcinomas epidermoides de la cabeza y el cuello (Mattijssen V, et al. 1993).

Como podemos ver, el estudio del comportamiento biológico tumoral, mediante estas técnicas auxiliares resulta de poca utilidad.

En los últimos años, los esfuerzos de varios grupos de investigadores han logrado una importante mejora en la comprensión del proceso de progresión tumoral, que nos ha proporcionado nuevas herramientas para identificar aquellos tumores con mayor

probabilidad de metastatizar y que, por tanto, podrían ser útiles para optimizar su manejo diagnóstico-terapéutico y establecer un pronóstico más preciso.

Estudios sobre la fisiopatología tumoral, así como el descubrimiento reciente de marcadores específicos del endotelio linfático y de los factores de crecimiento que lo estimulan, han posibilitado el estudio, por primera vez de forma convincente, de la microcirculación linfática tumoral, del proceso de linfangiogénesis tumoral y de los mecanismos por los que las células cancerosas entran en los capilares linfáticos.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

Los carcinomas se diseminan preferentemente por vía linfática. La presencia de vasos linfáticos intratumorales y la expresión del factor-C de crecimiento endotelial vascular (VEGF-C) favorecen la diseminación ganglionar en el carcinoma laringofaríngeo y, por tanto, influyen en su pronóstico.

3.1 DESARROLLO DE LA HIPÓTESIS

Se estudiaron dos grupos de pacientes: un grupo sin metástasis ganglionares y otro con ellas. En ambos grupos se estudiaron por separado la presencia y el tipo de LIT, la expresión del VEGF-C y distintas variables clinicopatológicas clásicas como: localización y tamaño tumoral, grado histológico, recidiva, edad del paciente y administración de tratamiento complementario con radioterapia. Por último, mediante un análisis estadístico, se procedió a relacionar estas variables entre sí y con la supervivencia global y libre de enfermedad.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

1. Identificar los vasos linfáticos iniciales intratumorales en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo mediante la expresión del marcador del endotelio linfático PA2.26 y establecer los criterios morfológicos de linfangiogénesis intratumoral.
2. Detectar la expresión tumoral del VEGF-C.
3. Analizar la relación de estas variables entre sí y con las distintas variables clinicopatológicas clásicas del carcinoma laringofaríngeo como: localización, tamaño tumoral, grado histológico, edad, administración de radioterapia postoperatoria y, especialmente, con las recidivas.
4. Analizar la influencia de las distintas variables en la supervivencia global y libre de enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL DE LA MUESTRA DE PACIENTES

Se realizó un estudio retrospectivo en 130 pacientes (128 hombres y 2 mujeres) sin tratamiento previo, intervenidos quirúrgicamente de un carcinoma epidermoide infiltrante laringofaríngeo. Los bordes quirúrgicos de las piezas fueron negativos. En función de la presencia o ausencia de metástasis ganglionares cervicales iniciales, demostradas de forma clínica (radiológica) o anatomopatológica, este grupo de pacientes se dividió en dos grupos: N(0) (ausencia de metástasis ganglionares) y N(+) (presencia de metástasis ganglionares). El grupo N(0) quedó conformado por 76 pacientes y el N(+) por 54. Los datos clínicos se obtuvieron del archivo del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario de la Princesa de Madrid. Las características de los dos grupos fueron las siguientes:

Grupo N(0). Ausencia de metástasis ganglionares

La media de edad de los pacientes incluidos en este grupo fue de 62,88 años con un intervalo de 41 a 87 años y una desviación estándar de ± 11 . El seguimiento medio de los pacientes fue 70,26 meses [40-128] con una desviación estándar de $\pm 26,48$ meses. Los pacientes se clasificaron en dos grupos según el tamaño tumoral: inicial [T1-T2] (48,7%) y avanzado [T3-T4] (51,7%).

Las localizaciones tumorales que se registraron fueron: supraglótica (34,2%), glótica (60,5%) e hipofaríngea (todos del seno piriforme) (5,3%).

Según su diferenciación histológica los tumores se agruparon como bien diferenciados (40%), moderadamente diferenciados (36%) y poco diferenciados (24%).

Grupo N(+). Presencia de metástasis ganglionares

La media de edad de este grupo fue de 60,11 \pm 9 años con un intervalo de 40 a 81 años.

El seguimiento medio fue de 40,02 \pm 31.3 meses [5-108].

La distribución de los dos grupos de pacientes en función del tamaño tumoral fue: inicial [T1-T2] (17,3%) y avanzado [T3-T4] (82,7%).

Las localizaciones tumorales fueron: supraglótica (61,5%), glótica (15,4%) e hipofaríngea (seno piriforme) (23,1%).

Los grados de diferenciación histológica observados fueron: bien diferenciados (19,2%), moderadamente diferenciados (32,7%) y poco diferenciados (48,1%).

A todos los pacientes, a excepción de los tumores T1a, se les realizó un TAC cervical.

En el grupo N(0), 11/76 pacientes (14,47%) recibieron radioterapia postoperatoria. A 27/76 pacientes (35,52%) se les realizó una disección cervical bilateral, a 17/76 (22,36%) unilateral y 32/76 pacientes (42,1%) no tuvieron tratamiento cervical inicial (29 de ellos eran estadios iniciales glóticos).

En el grupo N(+), a casi todos los pacientes se les administró radioterapia postoperatoria, 49/54 (90,75%), mientras que 5/54 pacientes (9,25%) no la recibieron. En todos los pacientes menos en uno (paciente con un tumor glótico T1b con afectación de comisura anterior) se realizó una disección cervical (98,14%). En 37/54 pacientes (68,52%) la disección cervical fue bilateral y en 16/54 (29,63%) unilateral.

La estadificación de los tumores se ajustó a la Clasificación TNM (6ª Edición 2002 de la AJCC/UICC) (*American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer*).

5.2 ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER LARINGOFARÍNGEO

El sistema de estadificación que se ha utilizado en este trabajo es el sistema de clasificación TNM (6ª edición (2002) de la AJCC/UICC) (<http://www.cancerstaging.org>). El sistema TNM es la expresión de la extensión anatómica de la enfermedad en cuestión y está basado en la evaluación de tres componentes:

T: Hace referencia al tamaño o extensión del tumor primario.

N: Hace referencia a la ausencia o presencia de metástasis linfáticas regionales y, en este último caso a su cantidad, localización y tamaño.

M: Hace referencia a la presencia o no de metástasis a distancia.

Laringe

Para la sistematización del estudio de la estadificación tumoral de la laringe es necesaria la división anatómica de este órgano en diversas regiones. El esquema de la división anatómica de la laringe es:

Supraglotis:

-Epilaringe:

-Epiglotis suprahioidea.

-Repliegues aritenopiglóticos.

-Aritenoides.

-Supraglotis excluyendo la epilaringe:

-Epiglotis infrahioides.

-Bandas.

-Ventriculos laríngcos.

Glottis:

-Cuerdas vocales.

-Comisura anterior.

-Comisura posterior.

Subglottis

Tumor Primario (T)

Tx: El tumor primario no se puede evaluar.

T0: No hay evidencia del tumor primario.

Tis: Carcinoma in situ.

Supraglotis

T1: El tumor está limitado a una sublocalización (¿localización?) de la supraglotis con movilidad normal de las cuerdas vocales.

T2: El tumor invade (afecta) la mucosa de más de una sublocalización (¿localización?) de la supraglotis adyacente o de la glottis o de alguna región fuera de la supraglotis (como por ejemplo la mucosa de la base de la lengua, vallécula o pared medial del seno piriforme) sin fijación de la laringe.

T3: Tumor limitado a la laringe con fijación de la cuerda vocal y/o con invasión de alguna de las siguientes zonas: área retrocricoides, espacio preepiglótico, espacio paraglótico y/o erosión menor del cartilago tiroides (cortical interna)

T4a: El tumor atraviesa el cartílago tiroides y/o invade tejidos más allá de la laringe (como por ejemplo: la tráquea, los tejidos blandos del cuello incluyendo la musculatura profunda extrínseca de la lengua, la musculatura pretiroidea, glándula tiroides o esófago).

T4b: El tumor invade (afecta) el espacio prevertebral, arteria carótida, o estructuras mediastínicas.

Glottis

T1: El tumor está limitado a la/s cuerda/s vocal/s (puede afectar a la comisura anterior o posterior) con movilidad normal.

T1a: El tumor está limitado a una cuerda vocal.

T1b: El tumor afecta a ambas cuerdas vocales.

T2: El tumor se extiende a la supraglotis y/o la subglotis, o con movilidad cordal disminuida.

T3: El tumor está limitado a la laringe con fijación de la cuerda vocal, y/o invasión del espacio paraglótico, y/o erosión menor del cartílago tiroides (cortical interna)

T4a: El tumor atraviesa el cartílago tiroides y/o invade tejidos más allá de la laringe (como por ejemplo: la tráquea, los tejidos blandos del cuello incluyendo la musculatura profunda extrínseca de la lengua, la musculatura pretiroidea, glándula tiroides o esófago).

T4b: El tumor invade (afecta) el espacio prevertebral, arteria carótida, o estructuras mediastínicas.

Subglotis

T1: El tumor está limitado a la subglotis.

T2: El tumor se extiende a la/s cuerda/s vocal/s con movilidad cordal normal o disminuida.

T3: El tumor está limitado a la laringe con fijación cordal.

T4a: El tumor atraviesa el cartílago tiroides y/o invade tejidos más allá de la laringe (como por ejemplo: la tráquea, los tejidos blandos del cuello incluyendo la musculatura profunda extrínseca de la lengua, la musculatura pretiroidea, glándula tiroides o esófago).

T4b: El tumor invade (afecta) el espacio prevertebral, arteria carótida, o estructuras mediastínicas.

Ganglios Linfáticos Regionales (N)

Nx: No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales.

N0: No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

N1: Metástasis en un único ganglio linfático homolateral igual o menor de 3 cm. de diámetro mayor.

N2a: Metástasis en un único ganglio linfático homolateral, de más de 3cm., pero de menos de 6 cm. de diámetro mayor.

N2b: Múltiples metástasis ganglionares homolaterales, ninguna mayor de 6 cm. de diámetro mayor.

N2c: Metástasis ganglionares contralaterales o bilaterales, ninguna mayor de 6 cm. de diámetro mayor.

N3: Metástasis ganglionar mayor de 6 cm. de diámetro mayor.

Metástasis a Distancia

Mx: No es posible evaluar las metástasis a distancia.

M0: No hay metástasis a distancia.

M1: Sí hay metástasis a distancia.

Hipofaringe

Para la sistematización del estudio de la estadificación tumoral, al igual que en la laringe también dividimos la hipofaringe en distintas localizaciones anatómicas que son las siguientes:

Área retrocricoidea: se extiende desde el nivel de los aritenoides al borde inferior del cartílago cricoides.

Seno piriforme: se extiende del repliegue faringoepiglótico al comienzo del esófago cervical. Lateralmente limita con el cartílago tiroides y medialmente con el repliegue aritenoepiglótico, cartílago aritenoides y cartílago cricoides.

Pared posterior faríngea: sus límites se extienden desde la vallecula hasta el nivel de las articulaciones cricoaritenoides.

Tumor Primario (T)

Tx: El tumor primario no se puede evaluar.

T0: No hay evidencia del tumor primario.

Tis: Carcinoma in situ.

T1: El tumor está limitado a una localización de la hipofaringe o mide 2 cm. o menos en su diámetro mayor.

T2: El tumor afecta a más de una localización de la hipofaringe o un lugar adyacente o mide más de 2 cm. pero menos de 4 cm., sin fijación de la hemilaringe.

T3: El tumor mide más de 4 cm. en su mayor dimensión o fija la hemilaringe.

T4a: El tumor afecta estructuras como los cartílagos tiroideos o cricoides, el hueso hioides, la glándula tiroides, el esófago o tejidos blandos cervicales como los músculos prelaríngeos o la grasa subcutánea.

T4b: El tumor afecta la fascia prevertebral, la arteria carótida o estructuras mediastínicas

Ganglios Linfáticos Regionales (N)

Nx: No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales.

N0: No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

N1: Metástasis en un único ganglio linfático homolateral igual o menor de 3 cm. de diámetro mayor.

N2a: Metástasis en un único ganglio linfático homolateral, de más de 3cm., pero de menos de 6 cm. de diámetro mayor.

N2b: Múltiples metástasis ganglionares homolaterales, ninguna mayor de 6 cm. de diámetro mayor.

N2c: Metástasis ganglionares contralaterales o bilaterales, ninguna mayor de 6 cm. de diámetro mayor.

N3: Metástasis ganglionar mayor de 6 cm. de diámetro mayor.

Metástasis a Distancia

Mx: No es posible evaluar las metástasis a distancia.

M0: No hay metástasis a distancia.

M1: Sí hay metástasis a distancia.

En función de la afectación de los distintos componentes (T, N, M), se establecen los distintos estadios tumorales del cáncer de laringe e hipofaringe.

Estadios Tumorales del Cáncer de Laringe y de Hipofaringe

Estadio 0:	Tis	N0	M0
Estadio I:	T1	N0	M0
Estadio II:	T2	N0	M0
Estadio III:	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IVA:	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Estadio IVB:	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IVC:	Cualquier T	Cualquier N	M1

5.3 CLASIFICACIÓN DEL GRADO HISTOLÓGICO

Se ha utilizado la clasificación realizada por la OMS para cáncer de laringe. Esta clasificación se basa en la queratinización y en las similitudes globales del epitelio tumoral con respecto al epitelio escamoso normal.

- G1: bien diferenciado.

- G2: moderadamente diferenciado.

- G3: pobremente diferenciado o anaplásico.

5.4 MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Se analizaron las piezas operatorias obtenidas del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de La Princesa. Todas las muestras se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina. Para el propósito del estudio se utilizaron las muestras más representativas de la lesión tumoral, así como muestras de tejido normal como patrón de referencia.

5.4.1 Valoración de la presencia de vasos linfáticos iniciales intratumorales mediante la expresión del antígeno PA2.26. Técnica inmunohistoquímica.

El anticuerpo policlonal anti PA2.26 humano se obtuvo mediante inmunización en conejo con un péptido sintético que comprendía los aminoácidos 37-51 (P_{37.51}) del ectodominio de la proteína PA2.26. El método de producción del anticuerpo ha sido descrito en detalle previamente (11). El antisuero anti-PA2.26 ha sido optimizado y analizada su expresión en una gran mayoría de tejidos humanos, demostrándose su especificidad para endotelio linfático. El epítipo que reconoce este antisuero no se enmascara con el formol, por lo que no es necesario emplear técnicas de desenmascaramiento. Las muestras de tejido fueron cortadas en un microtomo rotatorio a 3 µm. de espesor, se desparafinaron y se incubaron a temperatura ambiente, durante una hora, con el antisuero anti-PA2.26 a una dilución 1/4000. El complejo Envision+/- peroxidasa anti-conejo (HRP; Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) se empleó como

anticuerpo secundario. El producto de la reacción antígeno-anticuerpo se reveló con una solución de diaminobencidina y H_2O_2 . Los núcleos se tiñeron con hematoxilina de Harris (15 segundos) y las muestras se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes y se montaron con un medio permanente (Eukitt)(O. Kindler GmbH&Co.; Freiburg, Alemania).

5.4.2 Evaluación de la Linfangiogenesis Intratumoral (LIT).

En el análisis descriptivo de la arquitectura de la microcirculación se valoró la presencia de vasos linfáticos iniciales intratumorales. Como muestra control se utilizaron muestras de tejido obtenido de mucosa laríngea sana de los mismos pacientes. La evaluación de la linfangiogenesis se basó en criterios cualitativos como la presencia de vasos linfáticos iniciales en el seno de la masa tumoral, la íntima relación de estos vasos linfáticos con las células tumorales (Fig. 1 A y B) y, por último, la presencia de proliferación intravascular del endotelio linfático (Fig. 1 C y D).

Los casos en los que se observó la presencia de LIT se dividieron en dos grupos en función de la cantidad de linfáticos iniciales intratumorales observados, de forma que cuando el número fue mayor de dos en tres campos de (20x), se clasificaron como linfangiogenesis de alto grado; y cuando fue igual o menor de dos, como linfangiogenesis de bajo grado.

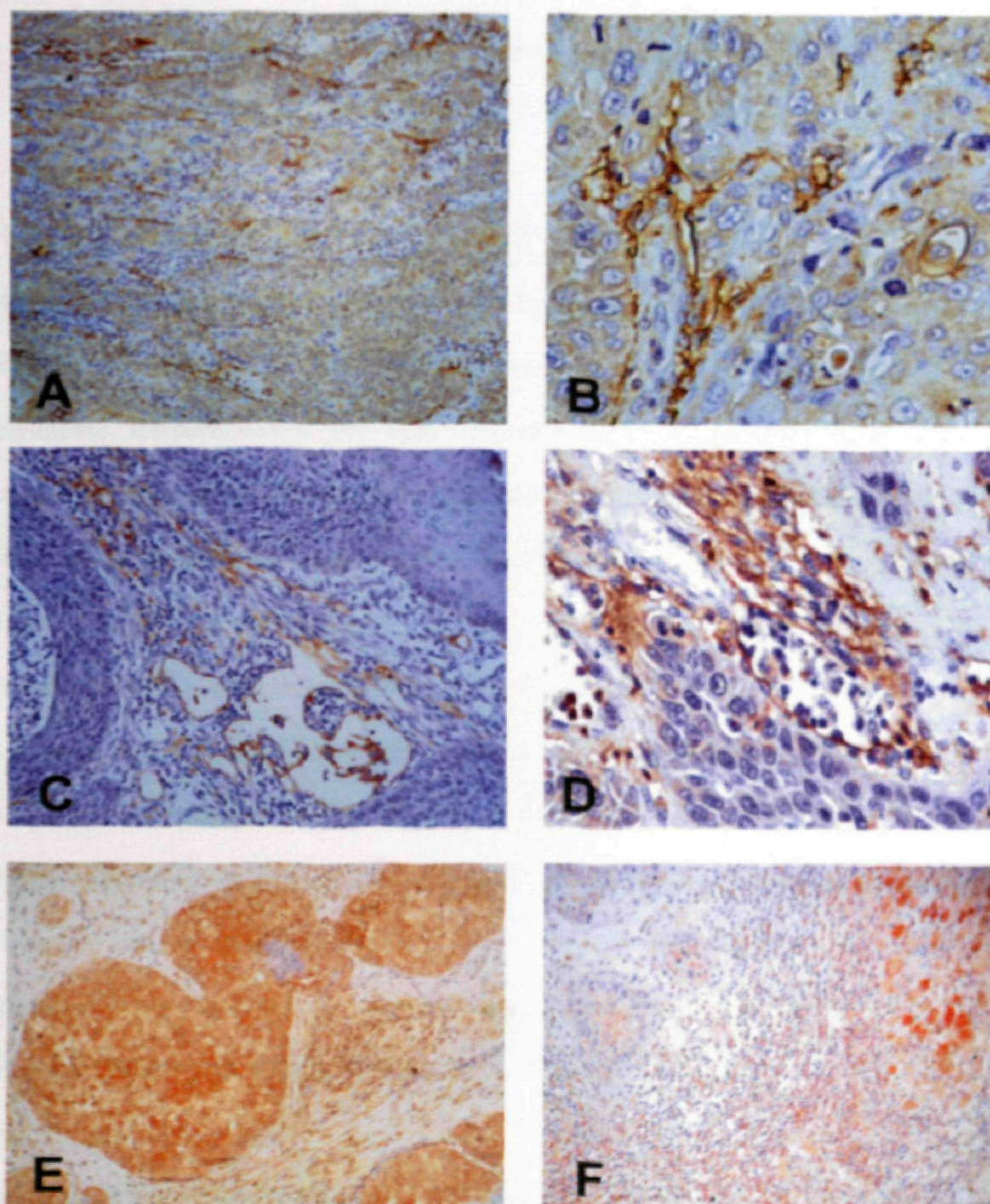


Figura 1

5.4.3 Valoración de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial-C (VEGF-C). Técnica inmunohistoquímica

La inmunotinción de VEGF-C se llevó a cabo mediante el método Envision⁺-peroxidasa (HRP; Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) con recuperación antigénica inducida por calor, utilizando tampón citrato a pH 8. Brevemente, los cortes incluidos en parafina fueron inicialmente desparafinados en xylol, rehidratándose en alcoholes de gradación decreciente y lavándose posteriormente en PBS (fosfato buffer salino). A continuación, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena y se procedió a la recuperación antigénica en olla a presión durante 2 minutos en tampón citrato a pH 8. Posteriormente, se incubó durante toda la noche con el antisuero de conejo anti-VEGF-C (Zymed Lab.; San Francisco, California, U.S.A.) a dilución 1/ 100. El complejo Envision⁺-peroxidasa anti-conejo fue utilizado como anticuerpo secundario. El producto de la reacción antígeno-anticuerpo se reveló con una solución de diaminobencidina y H₂O₂. Los núcleos se tiñeron con hematoxilina de Harris (15 segundos) y las muestras se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes, montándose en un medio permanente (Eukitt) (O. Kindler GMBH&Co.; Freiburg, Alemania).

5.4.4 Evaluación de la expresión del VEGF-C

Se estableció una escala de gradación visual subjetiva para cuantificar la intensidad de la expresión citoplasmática y granular del VEGF-C basada en un sistema semicuantitativo que iba de 0 a 3: 0 (ausencia de expresión detectable), 1 (expresión dudosa o muy débil), 2 (expresión moderada pero clara) y 3 (expresión intensa). En las muestras de tejido

estudiadas se observaron, con frecuencia en el mismo corte, zonas tumorales con distinta intensidad de expresión para el VEGF-C. En estos casos se consideró la zona de mayor intensidad como la expresión representativa de la muestra. En la evaluación final, los grados 2 y 3 se agruparon como expresión del VEGF-C positiva (Fig 1 E) y los grados 0 y 1, como expresión negativa (Fig 1 F).

Como tejido control se emplearon células musculares en estado de regeneración, nervio periférico (células Schwann), o macrófagos.

La evaluación de las muestras histológicas se realizó de forma consensuada por dos investigadores sin conocimiento de las características clínicas de los pacientes. En los casos dudosos se repitió la técnica sobre nuevos cortes.

5.5 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El estudio descriptivo de los datos consistió en el cálculo de la media y desviación estándar para variables cuantitativas y del cálculo de los porcentajes para las variables cualitativas.

La asociación entre variables cualitativas se estudió mediante el test de la Chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher, cuando éste era aplicable.

Para comparar las medias de las variables cuantitativas entre dos o más grupos, se utilizaron respectivamente el test de la t de Student o el análisis de la varianza.

El análisis del tiempo de supervivencia o de la supervivencia libre de progresión, se realizó mediante el método Kaplan-Meier, y la comparación entre los distintos subgrupos se efectuó mediante el test de log-rank. El control de los factores de confusión o de las interacciones para este tipo de variables tiempo dependientes, se consiguió mediante la construcción de distintos modelos de regresión de Cox.

Para el análisis multivariante de la incidencia de recidivas se empleó una regresión logística incondicionada.

En todos los casos, se consideró como estadísticamente significativos aquellos p-valores menores de 0,05. Todos los análisis se realizaron con la ayuda del programa SPSS versión 10.0, en la Unidad de Apoyo Metodológico de la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Universitario de la Princesa de Madrid.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 GRUPO N(0). AUSENCIA DE METÁSTASIS GANGLIONARES

Análisis de la presencia de LIT en el grupo N(0)

De los 76 pacientes que se estudiaron, se observaron signos morfológicos de linfangiogénesis intratumoral (LIT) en 35 (46%). La linfangiogénesis intratumoral fue de alto grado en 16 y de bajo grado en 19.

En el análisis univariante se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el tamaño del tumor primario y la presencia de LIT ($P=0,016$), de tal forma que cuanto mayor era el tumor primario, más frecuente fue la presencia de LIT. También se halló una relación significativa entre la presencia y grado de LIT y la aparición de recidivas. De los diez pacientes con recidivas, nueve presentaron LIT y en ocho de ellos, ésta fue de bajo grado. No se encontraron asociaciones significativas entre la presencia de LIT y la localización y el grado histológico del tumor primario o la edad de los pacientes (Tabla 1).

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA DE LIT
CON RESPECTO A LAS DISTINTAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS
EN EL GRUPO N(0)**

VARIABLES	LIT (+)	LIT (-) MODERADO	LIT (-) BAJO GRADO	VALOR P
Localización				0,387
Supraglótico	12 (46,2%)	7 (26,9%)	7 (26,9%)	
Glótico	28 (60,9%)	7 (15,2%)	11 (23,9%)	
Hipofaríngeo	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	
Tamaño				0,016
Inicial (T1-T2)	26 (70,3%)	4 (10,8%)	7 (18,9%)	
Avanzado (T3-T4)	15 (38,5%)	12 (30,8%)	12 (30,8%)	
Grado				0,874
Bien	13 (46,4%)	8 (28,6%)	7 (25%)	
Moderado	14 (56%)	4 (16%)	7 (28%)	
Poco	8 (50%)	4 (25%)	4 (25%)	
Recidiva				<0,001
No	40 (60,6%)	15 (22,7%)	11 (16,7%)	
Si	1 (10%)	1 (10%)	8 (80%)	
Edad	64,2	61,89	62,1	0,351

(Tabla 1)

Análisis de la expresión del VEGF-C en el grupo N(0)

La expresión del VEGF-C se evaluó en 75 pacientes y en 45 de ellos resultó positiva (60%).

Se halló una relación significativa entre los casos que recidivaron y la expresión del VEGF-C ($P=0,044$), de tal forma que de los diez pacientes que recidivaron, nueve expresaron el VEGF-C, frente al 55,4% que expresando también el VEGF-C no recurrieron. La relación entre la expresión del VEGF-C y la presencia y el grado de LIT tampoco resultó significativa ($P=0,143$) aunque se observó una tendencia a presentar una mayor cantidad de linfáticos intratumorales cuando la expresión del VEGF-C fue positiva. El 80% de los casos que presentaron linfangiogénesis intratumoral de alto grado, expresaron el VEGF-C, frente al 63,2% de los casos con linfangiogénesis de bajo grado y al 51,2% de los que no tuvieron linfangiogénesis. No se observó asociación entre

la expresión del VEGF-C y la localización, el tamaño y el grado histológico del tumor primario o la edad de los pacientes. (Tabla 2).

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL
VEGF-C CON ESPECTO A LAS DISTINTAS VARIABLES
CLÍNICOPATOLÓGICAS EN EL GRUPO N(0)**

VARIABLES	VEGF-C Negativo	VEGF-C Positivo	VALOR P
Localización			0,645
Supraglótico	12 (46,2%)	14 (53,8%)	
Glótico	17 (37,8%)	28 (62,2%)	
Hipofaríngeo	1 (25%)	3 (75%)	
Tamaño			0,641*
Inicial (T1-T2)	16 (43,2%)	21 (56,8%)	
Avanzado (T3-T4)	14 (36,8%)	24 (63,2%)	
Grado			0,168
Bien	7 (25,9%)	20 (74,1%)	
Moderado	12 (48%)	13 (52%)	
Poco	8 (50%)	8 (50%)	
LIT			0,143
LIT (-)	20 (48,8%)	21 (51,2%)	
LIT (+) Alto grado	3 (20%)	12 (80%)	
LIT (+) Bajo grado	7 (36,8%)	12 (63,2%)	
Recidiva			0,044*
No	29 (44,6%)	36 (55,4%)	
Si	1 (10%)	9 (90%)	
Edad	62,8	63,13	0,899

(Tabla 2) * Test Exacto de Fisher

Análisis de la supervivencia en el grupo N(0)

Ninguna de las variables analizadas en este estudio influyó de una forma estadísticamente significativa en la supervivencia global (Tabla 3).

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) CON
RESPECTO A LAS DISTINTAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS EN EL
GRUPO N(0)**

VARIABLES	VALOR P
Localización	0,754
Supraglótico	
Glótico	
Hipofaríngeo	
Tamaño	0,975
Inicial (T1-T2)	
Avanzado (T3-T4)	
Grado	0,244
Bien	
Moderado	
Poco	
LIT	0,29
LIT (-)	
LIT (+) Alto grado	
LIT (+) Bajo grado	
VEGF-C	0,929
Negativo	
Positivo	
Radioterapia	0,901
No	
Si	
Edad	0,28

(Tabla 3)

Sin embargo en nuestro modelo si existieron varios factores, que influyeron de forma significativa en el acortamiento del tiempo libre de enfermedad, como fueron la presencia y el grado de LIT ($P<0,001$) y la expresión del VEGF-C ($P=0,038$). Esta relación se confirmó en el análisis multivariante donde se comprobó que los pacientes que presentaron LIT de bajo grado y expresaron VEGF-C, tuvieron un periodo libre de enfermedad 16,2 y 8,44 veces más corto ($P=0,009$ y $P=0,045$) (Tabla 4) (Fig.I).

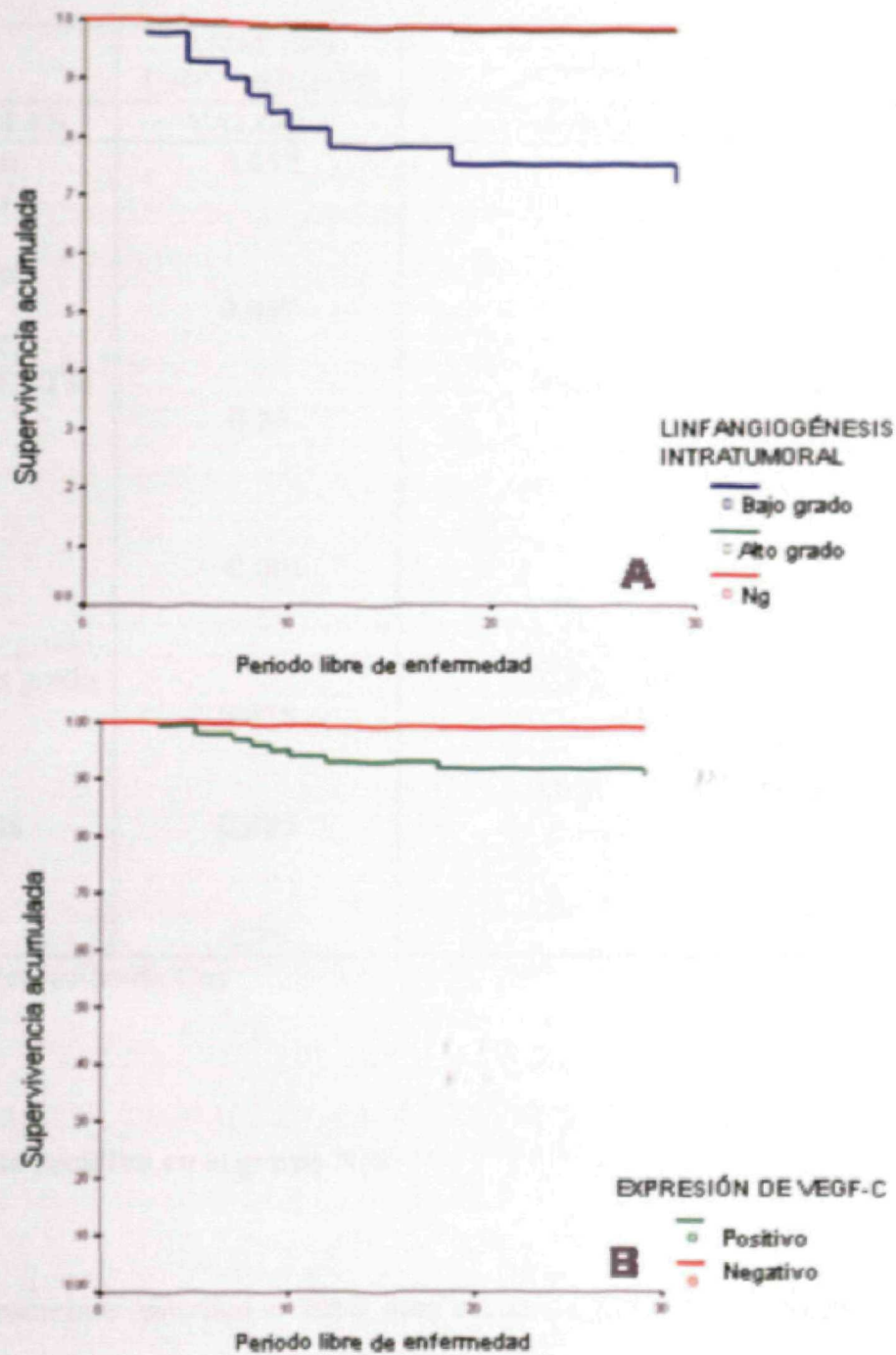


Figura I: La linfangiogénesis intratumoral de bajo grado (A) y la expresión del VEGF-C (B) se asocian a un acortamiento del periodo libre de enfermedad.

ANÁLISIS UNI Y MULTIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE) CON RESPECTO A LAS DISTINTAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS EN EL GRUPO N(0)

VARIABLES	ANÁLISIS UNIVARIANTE	ANÁLISIS MULTIVARIANTE*		
	VALOR P	VALOR P	HR	IC 95 %
Localización	0,652			
Supraglótico				
Glótico				
Hipofaríngeo				
Tamaño	0,057			
Inicial (T1-T2)				
Avanzado (T3-T4)		0,134	3,34	[0,69-16,22]
Grado	0,76			
Bien				
Moderado				
Poco				
LIT	<0,001			
LIT (-)				
LIT (+) Alto grado		0,924	1,15	[0,07- 19,36]
LIT (+) Bajo grado		0,009	16,2	[1,98-132,78]
VEGF-C	0,038			
Negativo				
Positivo		0,045	8,44	[1,05- 67,9]
Radioterapia	0,685			
No				
Si				
Edad	0,75			

(Tabla 4) *Regresión de Cox

Análisis de la recidiva en el grupo N(0)

De los 76 pacientes estudiados hubo diez recidivas (13.1 % del total), todas en los ganglios linfáticos cervicales regionales. Los pacientes 1, 5, 6 y 9 fallecieron (*), pero sólo los pacientes 6 y 9 lo hicieron a causa de su tumor. Las características de las recidivas se describen en la Tabla 5.

CUADRO DESCRIPTIVO DE LAS RECIDIVAS EN EL GRUPO N(0)

Paciente	Edad	Tamaño	Localización	Grado	LIT Grado	VEGF- C	RDT	Tto. inicial	Recidiva	SLE (meses)	SG (meses)
1	67	T2	Glott.	Bien	(+) Bajo	(+)	No	Hemilaring.	Cervical	5	33*
2	49	T3	Glott.	Mod.	(+) Bajo	(+)	No	LT+VCFI	Cervical Contralat	5	113
3	50	T3	Supra.		(+) Bajo	(+)	No	LT+VCFB	Cervical	3	79
4	74	T4	Supra.	Bien	(+) Bajo	(+)	Si	LT+VCFD	Cervical Contralat	29	99
5	77	T3	Supra.	Poco	(+) Alto	(+)	No	LT+VCFI	Cervical Contralat	12	48*
6	54	T3	Glott.	Bien	(-)	(+)	No	LT+VCFI	Cervical Contralat	9	16*
7	82	T3	Hipo.	Mod.	(+) Bajo	(+)	No	LTampl +VCFI	Cervical Homolat	7	38
8	73	T3	Supra.	Poco	(+) Bajo	(-)	No	LT	Cervical	18	51
9	41	T4	Glott.	Mod.	(+) Bajo	(+)	Si	LT	Cervical	10	10*
10	56	T2	Glott.	Poco	(+) Bajo	(+)	No	Hemilaring.	Cervical	8	41

(Tabla 5)

La presencia de LIT y la expresión del VEGF-C se relacionaron significativamente con la aparición de recidiva ganglionar cervical ($P < 0,001$ y $P = 0,044$). Estos resultados se confirmaron en el análisis multivariante mediante regresión logística, donde se observó que los pacientes con LIT de bajo grado y con expresión del VEGF-C incrementaron en 30,3 y 16,24 veces, las probabilidades de recaer en los ganglios linfáticos cervicales ($P = 0,005$ y $P = 0,032$). En los pacientes con los tumores de mayor tamaño se observó una tendencia ($P = 0,087$) a la recidiva cervical (Tabla 6).

**ANÁLISIS UNI Y MULTIVARIANTE DE LA RELACIÓN DE LA RECIDIVA
CON RESPECTO A LAS DISTINTAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS
EN EL GRUPO N(0)**

VARIABLES	ANÁLISIS UNIVARIANTE			ANÁLISIS MULTIVARIANTE**		
	RECIDIVA (-)	RECIDIVA (+)	VALOR P	VALOR P	OR	IC 95%
Localización			0,665			
Supraglótico	22 (84,6%)	4 (15,4%)				
Glótico	41 (89,1%)	5 (10,9%)				
Hipofaríngeo	3 (75%)	1 (25%)				
Tamaño			0,087*			
Inicial (T1-T2)	35 (94,6%)	2 (5,4%)				
Avanzado (T3-T4)	31 (79,5%)	8 (20,5%)		0,077	6,78	[0,81-56,71]
Grado			0,734			
Bien	25 (89,3%)	3 (10,7%)				
Moderado	22 (88%)	3 (12%)				
Poco	13 (81,3%)	3 (18,8%)				
LIT			<0,001			
LIT (-)	40 (97,6%)	1 (2,4%)				
LIT (+) Alto grado	15 (93,8%)	1 (6,3%)		0,972	0,95	[0,05-18,04]
LIT (+) Bajo grado	11 (57,9%)	8 (42,1%)		0,005	30,3	[2,77-331,42]
VEGF-C			0,044*			
Negativo	29 (96,7%)	1 (3,3%)				
Positivo	36 (80%)	9 (20%)		0,032	16,24	[1,27-207,33]
RDT			0,638*			
No	55 (87,3%)	8 (12,7%)				
Si	9 (81,8%)	2 (18,2%)				
Edad	63,3	62,3	0,831			

(Tabla 6) * Test Exacto de Fisher ** Regresión Logística

6.2 GRUPO N(+). PRESENCIA DE METÁSTASIS GANGLIONARES

Análisis de la presencia de LIT en el grupo N(+)

De los 54 pacientes que se estudiaron, en 39 (76%) se observaron signos morfológicos de linfangiogénesis intratumoral (LIT). En 19/54 (35,2%) la linfangiogénesis intratumoral fue de alto grado y en 20/54 (37%) fue de bajo grado. En el análisis univariante de la relación de la presencia de LIT con las distintas variables clinicopatológicas estudiadas, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa (Tabla 7).

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA RELACIÓN DE LA PRESENCIA LIT CON
RESPECTO A LAS DISTINTAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS EN EL
GRUPO N(+)**

VARIABLES	LIT (-)	LIT (+) (Alto Grado)	LIT (+) (Bajo Grado)	VALOR P
Localización				0,213
Supraglótico	9(28,1%)	9(28,1%)	14(43,8%)	
Glótico	3(33,3%)	2(22,2%)	4(44,4%)	
Hipofaríngeo	3(23,1%)	8(61,5%)	2(15,4%)	
Tamaño				0,918
Inicial (T1-T2)	3(33,3%)	3(33,3%)	3(33,3%)	
Avanzado (T3-T4)	12(26,7%)	16(35,6%)	17(37,8%)	
Grado				0,679
Bien	1(10%)	5(50%)	4(40%)	
Moderado	6(33,3%)	6(33,3%)	6(33,3%)	
Poco	8(30,8%)	8(30,8%)	10(38,5%)	
Recidiva				0,470
No	9(27,3%)	10(30,3%)	14(42,4%)	
Si	5(31,3%)	7(43,8%)	4(25%)	
Edad	61,4	60,3	60,01	0,774

(Tabla 7)

Análisis de la expresión del VEGF-C en el grupo N(+)

La expresión del VEGF-C se evaluó en 52 pacientes, y en 23 de ellos (44,2%) resultó positiva. Tampoco se hallaron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión del VEGF-C y las distintas variables analizadas (Tabla 8).

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL
VEGF-C CON RESPECTO A LAS DISTINTAS VARIABLES
CLÍNICOPATOLÓGICAS EN EL GRUPO N(+)**

VARIABLES	VEGF-C Negativo	VEGF-C Positivo	VALOR P
Localización			0,526
Supraglótico	19(59,4%)	13(40,6%)	
Glótico	3(37,5%)	5(62,5%)	
Hipofaríngeo	7(58,3%)	5(41,7%)	
Tamaño			0,989
Inicial (T1-T2)	5(55,6%)	4(44,4%)	
Avanzado (T3-T4)	24(55,8%)	19(44,2%)	
Grado			0,473
Bien	7(70%)	3(30%)	
Moderado	10(58,8%)	7(41,2%)	
Poco	12(48%)	13(52%)	
LIT			0,535
LIT (-)	8(53,3%)	7(46,7%)	
LIT (+) Alto grado	8(47,1%)	9(52,9%)	
LIT (+) Bajo grado	13(65%)	7(35%)	
Recidiva			0,851
No	18(56,3%)	14(43,8%)	
Si	8(53,3%)	7(46,7%)	
Edad	60,1	60,4	0,95

Análisis de la supervivencia en el grupo N(+)

En este grupo excluimos del análisis de supervivencia al factor radioterapia postoperatoria ya que la inmensa mayoría de los pacientes 49/54 (91%) la recibieron. Ninguna de las variables analizadas influyó de manera significativa sobre la supervivencia global o la supervivencia libre de enfermedad de este grupo (Tabla 9) (Tabla 10).

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) CON
RESPECTO A LAS DISTINTAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS EN EL
GRUPO N(+)**

VARIABLES	VALOR P
Localización	0,222
Supraglótico	
Glótico	
Hipofaríngeo	
Tamaño	0,927
Inicial (T1-T2)	
Avanzado (T3-T4)	
Grado	0,945
Bien	
Moderado	
Poco	
LIT	0,726
LIT (-)	
LIT (+) Alto grado	
LIT (+) Bajo grado	
VEGF-C	0,418
Negativo	
Positivo	
Edad	0,566

(Tabla 9)

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE
ENFERMEDAD (SLE) CON RESPECTO A LAS DISTINTAS VARIABLES
CLINICOPATOLÓGICAS EN EL GRUPO N(+)**

VARIABLES	VALOR P
Localización	0,609
Supraglótico	
Glótico	
Hipofaríngeo	
Tamaño	0,977
Inicial (T1-T2)	
Avanzado (T3-T4)	
Grado	0,518
Bien	
Moderado	
Poco	
LIT	0,782
LIT (-)	
LIT (+) Alto Grado	
LIT (+) Bajo Grado	
VEGF-C	0,547
Negativo	
Positivo	
Edad	0,624

(Tabla 10)

Análisis de la recidiva en el grupo N(+)

De los 49 pacientes en los que se pudo analizar esta variable, hubo 16 recidivas (32,7%) con 14 fallecimientos (*) a causa del tumor. Las características de las recidivas se describen en la (Tabla 11).

CUADRO DESCRIPTIVO DE LAS RECIDIVAS EN EL GRUPO N(+)

Paciente	Edad	Tamaño	Localización	Grado	LIT Grado	VEGF- C	RDT	Tto. Inicial	Recidiva	SLE (meses)	SG (meses)
1	56	T2	Supra.	Mod.	(+) Alto	(+)	No	LSupra +VCFB	Locoreg.	14	25*
2	66	T4	Supra.	Bien	(+) Alto	(+)	No	LT+VRI +VCFD	MTS Pulm.	32	48*
3	59	T3	Supra.	Mod.	(+) Bajo	(+)	Si	LTamp +VRD +VCFI	Local	11	12*
4	53	T3	Hipo.	Poco	(-)	(+)	Si	LTamp +VRI	MTS Osea	9	11*
5	68	T3	Supra.	Poco	(-)	(+)	Si	LT+VCFB	Local	52	98
6	59	T3	Glott.	Mod.	(-)	(+)	No	LT+VCFB	MTS Pulm.	19	23*
7	58	T2	Supra.	Bien	(-)	(-)	Si	LSupra +VCFB	Locoreg.	16	38*
8	53	T4	Glott.	Bien	(+) Bajo	(-)	Si	LTamp +VRD +VCFI	Reg.+ MTS Cutánea, Hepática	8	10*
9	61	T3	Supra.	Bien	(+) Bajo	(-)	Si	LT+VRI +VCFD	Regional	23	26*
10	67	T3	Hipo.	Poco	(+) Alto		Si	LTamp +VCFB	Regional	16	62
11	46	T3	Supra.	Poco	(+) Alto	(-)	Si	LT+VRI +VCFD	Locoreg.	4	9*
12	54	T4	Glott.	Poco	(+) Bajo	(+)	Si	LT+VCFB	Locoreg.	18	32*
13	56	T4	Hipo.	Bien	(+) Alto	(-)	Si	LTamp +VRI	Regional contralat. + MTS Pulm.	8	11*
14	47	T4	Supra.	Mod.	(-)	(-)	Si	LTamp +VCFB	Local	20	25*
15	49	T3	Supra.	Poco	(+) Alto	(-)	Si	LTamp +VCFB	Local	28	49*
16	54	T4	Hipo.	Poco	(+) Alto	(-)	Si	LT+VCFB	MTS Pulm.	20	39*

(Tabla 11)

Tampoco se observaron en este grupo asociaciones significativas entre las distintas variables clinicopatológicas analizadas y la aparición de recidivas (Tabla 12).

**ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA RELACIÓN DE LA RECIDIVA CON
RESPECTA A LAS DISTINTAS VARIABLES CLÍNICOPATOLÓGICAS EN EL
GRUPO N(+)**

VARIABLES	RECIDIVA (-)	RECIDIVA (+)	VALOR P
Localización			0,947
Supraglótico	19(67,9%)	9(32,1%)	
Glótico	5(62,5%)	3(37,5%)	
Hipofaríngeo	9(69,2%)	4(30,8%)	
Tamaño			0,614
Inicial (T1-T2)	6(75%)	2(25%)	
Avanzado (T3-T4)	27(65,9%)	14(34,1%)	
Grado			0,364
Bien	5(50%)	5(50%)	
Moderado	13(76,5%)	4(23,5%)	
Poco	15(68,2%)	7(31,8%)	
LIT			0,470
LIT (-)	9(64,3%)	5(35,7%)	
LIT (+) Alto Grado	10(58,8%)	7(41,2%)	
LIT (+) Bajo Grado	14(77,8%)	4(22,2%)	
VEGF-C			0,851
Negativo	18(69,2%)	8(30,8%)	
Positivo	14(66,7%)	7(33,3%)	
Edad	60,4	60,1	0,89

(Tabla 12)

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

7.1 ORIGEN Y FORMACIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO

En los seres humanos los primeros sacos linfáticos se observan en embriones de 6-7 semanas (van der Putte SCJ, 1975). Esto supone casi un mes de retraso con respecto al desarrollo de los primeros vasos sanguíneos.

En la actualidad se manejan dos teorías para explicar el origen de los vasos linfáticos:

- 1) Hace alrededor de un siglo que Sabin propuso que los sacos linfáticos primitivos se originaban a modo de "brotes" o "yemas" de células endoteliales a partir de las vénulas embrionarias preexistentes (Sabin FR, 1902). Posteriormente, el sistema linfático se extendía a partir de estos sacos linfáticos primarios mediante la formación de sucesivos brotes. Esta teoría de Sabin se ha visto apoyada por hallazgos recientes en los que se demuestra que las células endoteliales que forman los sacos linfáticos germinales o primitivos a partir de la Vena Cardinal Anterior en el embrión de ratón expresan dos marcadores linfáticos específicos: el VEGFR-3 y el factor de transcripción Prox-1 (Dumont DJ, et al. 1998; Kaipainen A, et al. 1995; Wigle JT, et al. 1999). Después de la formación inicial del sistema vascular sanguíneo, las células endoteliales venosas comienzan a responder a señales linfangiogénicas. La primera señal que indica que la linfangiogénesis ha comenzado sobre el día embrionario 9,5 (E 9,5) es la expresión específica de Prox-1 en una población (subpoblación) restringida de células endoteliales localizada en un lado de la Vena Cardinal Anterior. En esta etapa el marcador linfático LYVE-1 se expresa uniformemente en las células

endoteliales de la Vena Cardinal Anterior. Sobre el E-10.5 células con doble expresión de Prox-1 y LYVE-1 comienzan a "brotar" y a migrar de forma polarizada (Wigle JT, et al. 2002). Estos "brotes" de células endoteliales linfáticas, con el tiempo dan lugar a los sacos linfáticos primarios, desde los que los vasos linfáticos se extienden hacia los tejidos periféricos del embrión (Wigle JT, et al. 1999). Todas las células endoteliales de las vénulas pueden ser originariamente bipotentes, pero a partir de la expresión asimétrica al menos de Prox-1 en una subpoblación celular, estas células quedan comprometidas para la diferenciación linfática (Wigle JT, et al. 2002). La actividad de Prox-1 no se requiere para iniciar la formación de los brotes de células endoteliales desde la Vena Cardinal, pero sí para el mantenimiento de este proceso (Wigle JT, et al. 1999). A medida que las células brotan de manera polarizada, van expresando nuevos marcadores del endotelio linfático como la SLC (*Secondary Lymphoid Organ Chemokine*) (Wigle JT, et al. 2002). También la expresión de VEGFR-3 se mantiene en niveles elevados en estas células, mientras que su expresión va haciéndose paulatinamente más débil en la vascularización sanguínea. La expresión simultánea de LYVE-1, Prox-1, VEGFR-3 y SLC, puede indicar la diferenciación irreversible de estas células a la estirpe de las células endoteliales linfáticas.

- 2) La teoría alternativa sugiere que los sacos linfáticos iniciales, primitivos o germinales surgen en el seno del mesénquima, a partir de células precursoras independientes de las venas, y que la conexión con el sistema venoso aparece más tardíamente en el desarrollo (Huntington GS and McClure CFW, 1908). Se ha demostrado, al menos en las aves (*chick-quail chimera model*), que los

linfangioblastos mesodérmicos, como precursores de las células linfáticas, participan en el desarrollo del sistema linfático. Esto apoya el hecho de que los vasos linfáticos periféricos se puede desarrollar por múltiples mecanismos, al menos en las aves (Papoutsi M, et al. 2001; Schneider M, et al. 1999; Wilting J, et al. 1999; Wilting J, et al. 2000).

Es posible que ambos mecanismos contribuyan a la formación del sistema linfático también en los mamíferos.

La linfangiogénesis tumoral podría remedar a la linfangiogénesis embrionaria. Probablemente en la linfangiogénesis tumoral las nuevas células endoteliales linfáticas se originen a partir de los vasos linfáticos preexistentes o a partir de los vasos sanguíneos tumorales. La expresión, como en la etapa embrionaria, del VEGFR-3 por los vasos sanguíneos inducidos por la angiogénesis tumoral apoya la teoría habitualmente aceptada de que los vasos linfáticos derivan de los vasos sanguíneos y, particularmente de las venas. Por otro lado, al igual que en la formación de los vasos sanguíneos durante la embriogénesis, células precursoras circulantes por las corrientes sanguínea o linfática, también podrían participar en la linfangiogénesis (Clarijs R, et al. 2001).

7.2 FACTORES DE CRECIMIENTO LINFÁTICO

A. VEGF-C y VEGF-D

Hasta la fecha se han identificado dos factores linfangiogénicos que forman parte de la familia VEGF: el VEGF-C y el VEGF-D. Los miembros de la familia VEGF se secretan en forma de glicoproteínas diméricas. Estas glicoproteínas juegan un papel preponderante en la formación de los vasos sanguíneos y linfáticos. La familia VEGF en los mamíferos está constituida por cinco miembros: VEGF o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, así como el factor de crecimiento placentario (*Placental Growth Factor-PGF*). Además, adicionalmente se han detectado varios homólogos virales como el VEGF-E (Pepper MS, et al 2003; Lohela M, et al. 2003). Los diversos componentes de la familia VEGF actúan sobre las células endoteliales a través de su unión a tres receptores diferentes de tipo Tirosina-Kinasa denominados VEGFRs y que son: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 (Pepper MS, et al. 2003). Los VEGFRs se parecen estructural y funcionalmente a los miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas [*platelet derived growth factor (PDGF)*] y constituyen una subfamilia dentro de esa clase de receptores (Karkkainen MJ, et al. 2000).

El VEGFR-1 se une al: VEGF-A, VEGF-B y al PlGF. El VEGFR-2 se une al: VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D. El VEGFR-3 se une sólo al VEGF-C y al VEGF-D.

En los tejidos adultos, los receptores VEGFR-1 y 2 se expresan fundamentalmente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. El receptor VEGFR-2 también se ha detectado en el endotelio linfático donde su papel es menos claro. La activación de estos receptores promueve la proliferación celular, migración, diferenciación, supervivencia de las células endoteliales sanguíneas, además de aumentar la permeabilidad vascular y de

inducir la angiogénesis fisiológica y patológica (Pepper MS, et al 2003; Lohela M, et al. 2003).

Durante la embriogénesis del ratón, el receptor VEGFR-3 se expresa inicialmente en los angioblastos del mesénquima cefálico, de la aorta dorsal, de la vena cardinal y del alantoides (Kaipainen A, et al. 1995; Dumont DJ, et al. 1998). Al E12,5 el VEGFR-3 se expresa tanto en el endotelio venoso como en el presunto o supuesto endotelio linfático, pero posteriormente durante el desarrollo, la expresión del VEGFR-3 se restringe casi sólo al endotelio linfático (Kaipainen A, et al. 1995).

En la mayoría de los tejidos humanos adultos, la expresión del VEGFR-3 está restringida al endotelio linfático, aunque también se ha podido observar en el endotelio de algunos vasos sanguíneos fenestrados con un elevado transporte activo de moléculas a través de la pared del vaso (Partanen TA, et al. 2000).

La alteración genética del VEGFR-3 da lugar a una remodelación defectuosa del plexo vascular primario, hematopoyesis alterada, fallo cardiovascular y muerte del embrión al E9.5. Sin embargo, la diferenciación de las células endoteliales y la formación de las redes vasculares primitivas son normales en los embriones sin VEGFR-3, lo que indica que la función del VEGFR-3 no es necesaria para estas etapas iniciales del desarrollo vascular (Dumont DJ, et al. 1998).

La activación del VEGFR-3 promueve la proliferación y migración de las células endoteliales linfáticas y la linfangiogénesis fisiológica como se puede observar por el hecho de que la linfangiogénesis se inhibe con una forma soluble de VEGFR-3 que compite con los receptores endógenos por el ligando (Makinen T, et al. 2001). Además, experimentos *in vitro* con VEGFR-3 y un mutante específico del VEGF-C denominado VEGF-156S, han demostrado que la estimulación aislada del VEGFR-3, es suficiente para proteger la células endoteliales linfáticas de la apoptosis y para estimular su

migración (Joukov V, et al. 1998; Makinen T, Veikkola T, et al. 2001). La señalización por el VEGFR-3 también promueve la linfangiogénesis patológica, la angiogénesis fisiológica y patológica y la extravasación por los vasos sanguíneos (Lohela M, et al. 2003).

Los factores de crecimiento VEGF-C y D se secretan como homodímeros sobre los que se efectúa un procesamiento proteolítico en dos etapas de sus dominios N- y C-terminales (Joukov V, et al. 1997). El procesamiento de los factores VEGF-C y D modifica la afinidad de estos para unirse a su receptor, y de este modo modula sus efectos biológicos (Lohela M, et al. 2003). La forma recién secretada (inmadura) de VEGF-C y D con un peso molecular de 31 KDa, activa fundamentalmente al receptor VEGFR-3, mientras que la forma madura, completamente procesada y con un peso molecular de 21 KDa, activa a los receptores VEGFR-2 y 3, (Pepper MS, et al. 2003) aumentando la afinidad por el VEGFR-3 en aproximadamente 400 veces (Pepper MS, 2001). Los efectos *in vivo* del VEGF-C y del VEGF-D parece ser que difieren, en los distintos modelos animales y en los diferentes tejidos. Diferencias en el procesamiento proteolítico, disponibilidad de receptores y los tipos de vasos, pueden también modular los efectos biológicos del VEGF-C y VEGF-D (Lohela M, et al. 2003).

También se han identificado otras moléculas que tienen un papel importante en el desarrollo del sistema linfático, que son:

- Angiopoyetina-2 (Gale NW, et al. 2002)
- Neuropilina-2 (Yuan L, et al. 2002).
- Prox-1 (Wigle JT y Oliver G, 1999).

B. Angiopoyetinas y receptores Tie.

Además de los distintos miembros de la familia VEGF, también se ha demostrado que otras moléculas como las angiopoyetinas y los receptores Tie intervienen en la formación del sistema vascular (Jones N, et al. 2001). Los receptores Tie son receptores de tipo Tirosina-Kinasa y hay dos descritos: el Tie-1 y el Tie -2 o Tek. Los Tie-1 y Tie-2 se expresan de forma predominantemente por las células endoteliales vasculares.

Hasta la fecha, se conocen cuatro angiopoyetinas (Ang-1, Ang-2, Ang-3 y Ang-4). Todas ellas se unen al receptor Tie-2 y median señales de estabilización en los vasos, mientras que el receptor Tie-1 no tiene un ligando conocido (Lohela M, et al. 2003). La Ang-1 y la Ang-4 activan al receptor Tie-2, mientras que la Ang-2 y Ang-3 parece que funcionan como antagonistas específicos e inhiben la señalización del Tie-2, al menos en algunas situaciones. El estudio de ratones deficientes en Ang-2 ha revelado que es probable que las angiopoyetinas también tengan un papel en el desarrollo linfático (Giale NW, et al. 2002). Se sugiere que tanto la Ang-1 como la Ang-2 desempeñan un papel en la linfangiogénesis como agonistas. Como en la angiogénesis, las angiopoyetinas puede que contribuyan a la remodelación y estabilización de los vasos linfáticos neoformados. Se necesitan más estudios que caractericen el papel de las angiopoyetinas en el desarrollo de los vasos linfáticos.

El patrón de expresión del receptor Tie-2 en los vasos sanguíneos y linfáticos es poco conocido. Se ha demostrado que el receptor Tie-1 se expresa en el endotelio linfático durante la embriogénesis desde el E13,5 y que esta expresión se mantiene en los adultos, pero su función en las células endoteliales linfáticas, por el momento se desconoce (Iljin K, et al. 2002).

C. Neuropilina-2

Las neuropilinas 1 y 2 (NRP-1 y NRP-2) son glicoproteínas de la membrana celular con colas citoplasmáticas cortas. Mediante su unión a varios miembros de la familia VEGF, las neuropilinas puede que actúen como correceptores para las VEGFRs incrementando la eficiencia de su señalización (Giraud E. et al. 1998). Se ha visto que la NRP-2 se une al VEGF-C, lo que sugiere que puede estar implicada en la señalización mediada por el receptor VEGFR-3 en los linfáticos (Karkkainen MJ et al. 2001).

Los ratones con supresión del gen de la NRP-2 muestran una ausencia o una gran reducción de los pequeños vasos y capilares linfáticos durante el desarrollo, lo que indica que se requiere de forma selectiva la NRP-2 para el desarrollo linfático (Yuan L. et al. 2002).

D. Prox-1

El Prox-1 es un factor de transcripción implicado en el desarrollo y diferenciación de las células endoteliales linfáticas durante el desarrollo embrionario (Wigle JT y Oliver G, 1999). Se ha demostrado que es esencial para el desarrollo del sistema linfático murino, como se ha comprobado en el caso de ratones sin Prox-1 que carecen de células endoteliales linfáticas (Wigle JT, et al.1999). La actividad del Prox-1 no es necesaria para el comienzo de la formación de brotes de células endoteliales desde la vena cardinal, pero sí para el mantenimiento de este proceso (Wigle JT, et al.1999). La sobreexpresión del Prox-1 fue capaz de inducir la transcripción de genes específicos de células endoteliales linfáticas en células endoteliales sanguíneas y de suprimir la transcripción de genes específicos de células endoteliales sanguíneas (Petrova TV, et al.

2002). En este sentido se observó que el Prox-1 reguló al alza la expresión de VEGFR-3 en las células endoteliales sanguíneas y que también indujo intensamente la expresión otro factor específico de las células endoteliales linfáticas, el p57kip2. El Prox-1, por tanto, se ha mostrado como un importante factor de diferenciación de las células endoteliales linfáticas. Además, algunos experimentos sugieren que los distintos fenotipos celulares del endotelio vascular adulto son plásticos y sensibles a la reprogramación transcripcional, lo que podría ser de utilidad para futuras aplicaciones terapéuticas sobre las células endoteliales (Wigle JT, et al. 2002; Petrova TV, et al. 2002).

7.3 MARCADORES DEL ENDOTELIO LINFÁTICO

Hasta hace muy poco tiempo el estudio de los vasos linfáticos era difícil, por la imposibilidad de distinguirlos de forma fiable mediante criterios morfológicos. El descubrimiento en estos últimos años de marcadores específicos del endotelio linfático ha supuesto un avance fundamental en el campo de la microcirculación linfática (Jussila L, et al. 2002). Hasta entonces, los vasos linfáticos se identificaban por linfangiografía, o por medio de métodos inmunohistoquímicos con marcadores poco selectivos que combinaban marcadores panendoteliales con marcadores de la lámina basal, como en el caso de las combinaciones del marcador panendotelial PECAM-1/CD31, con los marcadores de la membrana basal laminina y colágeno tipo IV. (Stacker SA, et al. 2002; Nerlich AG, et al. 1991; Otsuki Y, et al. 1990). También se ha utilizado la actividad de la 5' Nucleotidasa para la identificación del endotelio linfático (Sleeman JP, et al. 2001).

Con el descubrimiento de los marcadores específicos del endotelio linfático, la identificación de los vasos linfáticos se ha hecho más precisa y sencilla. Estos nuevos marcadores son los siguientes:

A. VEGFR-3

Fue el primer marcador endotelial linfático descubierto. Es un receptor de tipo Tirosina Kinasa y sus ligandos son VEGF-C y VEGF-D (Jussila L, et al. 1998; Kaipainen, et al. 1995). También se expresa fisiológicamente en algunos vasos sanguíneos fenestrados y en los vasos sanguíneos en el contexto de la angiogénesis de determinadas condiciones patológicas como son los tumores y la curación de heridas (Partanen TA, et al. 2000; Valtola R, et al. 1999).

B. Podoplanina

Es una mucoproteína de 38 KDa de la membrana de los podocitos glomerulares. La podoplanina está presente en los vasos linfáticos iniciales, pero no en los mayores que tienen células musculares lisas. Todos los vasos sanguíneos son negativos para la expresión de podoplanina (Jussila L, et al. 2002). También se expresa en determinadas células no endoteliales como: osteoblastos, podocitos renales y células alveolares pulmonares tipo I (Breiteneder-Geleff S, et al. 1999).

C. Prox-1

Es un factor de transcripción implicado en el crecimiento y diferenciación de los vasos linfáticos durante el desarrollo. También se expresa en células no endoteliales en el cristalino, corazón, hígado, páncreas y sistema nervioso (Wigle JT, et al 1999).

D. LYVE-1

Es un receptor para el ácido hialurónico del endotelio de los vasos linfáticos y está implicado en su transporte por las células endoteliales linfáticas. Este marcador también se expresa en epitelios normales del riñón, páncreas, tiroides, células endoteliales de los sinusoides hepáticos (Carreira CM, et al. 2001; Banerji S, et al. 1999) y en el endotelio de las células vasculares sanguíneas del pulmón normal (Stacker SA, et al. 2002).

Todos estos marcadores del endotelio linfático muestran patrones de expresión superponibles en la mayoría de los tejidos. Sin embargo, descubrimientos recientes han demostrado que al menos el VEGFR-3 y el LYVE-1 pueden expresarse también en el endotelio de los vasos sanguíneos en condiciones fisiológicas (Stacker SA, et al. 2002; Partanen TA, et al 2000; Carreira CM, et al. 2001). Todavía es necesario obtener más información para clarificar la especificidad de estos marcadores en los vasos linfáticos de los procesos patológicos. Hasta entonces, en opinión de algunos autores, se deberían utilizar varios marcadores para confirmar la expresión (Jussila L, et al. 2002). Sin embargo, para otros, todos los marcadores han demostrado ser fiables para distinguir el endotelio linfático del sanguíneo, aunque ninguno de ellos es estrictamente específico (Sleeman JP, et al. 2001).

E. PA2.26

En los últimos años también se ha identificado el nuevo marcador molecular del endotelio linfático PA2.26. Este antígeno, que ya ha sido utilizado con anterioridad en otro trabajo (Muñoz-Guerra MF, et al. 2004) y que ha sido empleado por nosotros en este estudio, fue identificado en nuestro laboratorio como una pequeña glicoproteína transmembranal de tipo mucina de 172 aminoácidos. Su expresión se induce en queratinocitos y células del estroma durante la carcinogénesis de la piel del ratón. El PA2.26 se localiza en extensiones de la membrana plasmática donde interacciona con el citoesqueleto de actina a través de su asociación con ezrina o moesina, asociándose con la migración celular. Sin embargo su presencia en células del endotelio linfático sugiere otras funciones biológicas que todavía deberán determinarse (Martín-Villar E, et al. 2004; Scholl FG, et al. 1999; Scholl FG, et al. 2000). Debido a que recientemente se han identificado mucoproteínas o-glicosiladas como receptores para las selectinas que median en la adhesión de las células inflamatorias (Sassetti C, et al. 2000) es posible que el PA2.26 juegue un papel parecido en el endotelio linfático.

El PA2.26 se expresa en diferentes tipos celulares, pero es especialmente selectivo del endotelio linfático. El PA2.26 y la podoplanina son antígenos estables en los linfáticos tumorales, mientras que, al menos el VEGFR-3, se expresa también en vasos sanguíneos tumorales. Nuestro equipo ha desarrollado un anticuerpo monoclonal frente al antígeno murino y un antisuero frente al antígeno humano. El antisuero anti-PA2.26 tiene gran afinidad y reconoce un epítipo en la porción extracelular que no se enmascara con la fijación en formol, siendo muy útil para la identificación de vasos linfáticos en tejidos incluidos en parafina.

La secuencia de 1.013 pares de bases del ADNc de la podoplanina humana que está registrada en el *GenBank* (con número de acceso AF390106) es idéntica a la obtenida por nuestro laboratorio para el PA2.26 (*GenBank* con número de acceso AY194238).

De todos estos marcadores moleculares identificados, la podoplanina y el PA2.26 se consideran como los más específicos para el endotelio linfático en roedores y en humanos (Martín-Villar E, et al. 2004; Scholl FG, et al. 1999; Scholl FG, et al. 2000; Kriehuber E, et al. 2001).

En este estudio la utilización del PA2.26, nos ha permitido una fácil diferenciación entre los vasos linfáticos y sanguíneos, utilizando el microscopio óptico convencional.

7.4 ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA DEL SISTEMA LINFÁTICO EN EL ADULTO

Hay cinco categorías principales de estructuras vasculares en el sistema linfático:

- Vasos linfáticos iniciales (objeto de este estudio)
- Vasos colectores
- Ganglios linfáticos
- Troncos linfáticos
- Conductos (como por ejemplo el conducto torácico)

Sus diámetros oscilan entre las 10 micras y los 2 milímetros.

Los vasos linfáticos iniciales son estructuras terminadas en fondo de saco que están óptimamente diseñadas para la recogida o captación de fluidos y partículas. De manera similar a los capilares sanguíneos, los vasos linfáticos iniciales están formados por una capa simple de células endoteliales no fenestradas, pero su estructura es distinta a la de

los capilares sanguíneos en varios aspectos importantes (Casley-Smith JR, et al 1961, Daroczy J, 1988; Leak L.V, 1970):

- Normalmente tienen una luz más amplia e irregular (10-60 micras de diámetro) que los capilares sanguíneos.
- Su endotelio se caracteriza por poseer un citoplasma extraordinariamente escaso, excepto en la región perinuclear.
- Al contrario que en los vasos sanguíneos, la membrana basal de los linfáticos iniciales no existe o está poco desarrollada.
- No están rodeados de pericitos.
- Los principales tipos de uniones intercelulares en los vasos sanguíneos, las uniones estrechas y las *adherens*, no se observan con tanta frecuencia en los vasos linfáticos iniciales. En los vasos sanguíneos estas uniones mantienen unidas y en íntimo contacto a las células endoteliales, por el contrario, en los linfáticos, representan puntos focales de unión intercelular
- Comparado con los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos son un sistema de bajo flujo y de baja presión, y mucho menos coagulable debido a la falta de plaquetas y eritrocitos (Alitalo K, et al. 2002).
- El sistema linfático tiene menos ramificaciones y está organizado en forma de una red menos compleja que el sistema vascular sanguíneo (Witte MH, et al. 1997).
- Una de las características más notables de los vasos linfáticos iniciales es su íntima asociación con el intersticio circundante. Las células endoteliales linfáticas están íntimamente conectadas al tejido circundante (intersticio) por medio de filamentos de fibras elásticas (Gerli R, et al. 1991). Estos filamentos de anclaje están unidos a la superficie extraluminal de las células y se extienden en la

profundidad del tejido conectivo circundante, uniendo firmemente el endotelio linfático con las fibras de la matriz extracelular. A medida que aumenta el fluido intersticial, y, con ello la presión del intersticio, estas fibras comienzan a tensarse, abriendo la luz de los linfáticos. Conforme la luz va aumentando de diámetro, las células endoteliales linfáticas, que en condiciones normales están superpuestas, se van separando, creando aberturas interendoteliales pseudovalvulares que permiten el paso de macromoléculas y fluidos hacia la luz del vaso linfático (Skobe M, et al. 2000; Stacker SA, et al 2002).

- Las células endoteliales linfáticas tienen numerosas invaginaciones y vesículas citoplasmáticas, tanto en la superficie luminal como en la extraluminal, que están implicadas en el transporte transendotelial de moléculas hacia el interior de la luz (Cornford ME, et al. 1993).

Desde los capilares linfáticos la linfa drena a los linfáticos colectores. A diferencia de los linfáticos iniciales, los vasos colectores no suelen estar anclados a la matriz extracelular, pero, en cambio, tienen músculo liso y, por tanto, pueden mantener la luz frente al estrés circunferencial intersticial. También tienen válvulas unidireccionales que ayudan a la progresión de la linfa y previenen el reflujo. Los segmentos de linfáticos colectores entre válvulas se denominan linfangiones. Cada linfangión funciona como un compartimento contráctil que propulsa la linfa hacia el siguiente compartimento. La linfa fluye desde los tejidos por la compresión de los vasos linfáticos iniciales por la musculatura esquelética adyacente y, además, la contractibilidad de los vasos linfáticos colectores también contribuye a la progresión de la linfa (Lohela M, et al. 2003). Cuando el vaso linfático se rellena de fluido, la pared del vaso automáticamente se contrae. Las válvulas en los vasos linfáticos ayudan a mantener un flujo unidireccional en la red linfática. Todos los linfáticos colectores pasan a través de uno o, habitualmente, varios ganglios linfáticos

(ganglios centinelas). Según lleven la linfa hacia los ganglios o, desde los ganglios se clasifican como:

- Prenodales, aferentes o preganglionares
- Postnodales, eferentes o postganglionares

La linfa de los grupos de ganglios linfáticos, pasa a los troncos linfáticos y acaba en los conductos linfáticos. Éstos últimos devuelven la linfa a la circulación sanguínea completando el circuito.

7.5 FUNCIONES DEL SISTEMA LINFÁTICO

Cuando la sangre circula a través del sistema vascular se extravasan de manera inevitable fluidos y macromoléculas. Una red de vasos linfáticos iniciales recolecta estos fluidos y macromoléculas de los tejidos y los transfiere como linfa de nuevo al torrente sanguíneo (Alitalo K, et al. 2002). Con esto se consigue el mantenimiento del volumen plasmático y de la presión intersticial (Stacker SA, et al. 2002).

En el intestino delgado, en una función similar de captación de macromoléculas, los vasos linfáticos recogen grandes proteínas y lípidos que no pueden pasar a través de las fenestraciones de los capilares absortivos (1) 41.

Además del transporte de fluidos y macromoléculas, los vasos linfáticos también desempeñan una función inmunitaria mediante el transporte de leucocitos y de células presentadoras de antígeno del espacio intersticial de los tejidos a los diversos órganos linfoides, en donde desarrollan una respuesta inmune. El paso de leucocitos y de células presentadoras de antígeno de los tejidos periféricos a los vasos linfáticos (Fig. 2 A y B) se realiza de forma activa mediante la acción de quimiocinas y moléculas de adhesión (Lohela M, et al. 2003). Las células tumorales podrían utilizar los mismos caminos, que

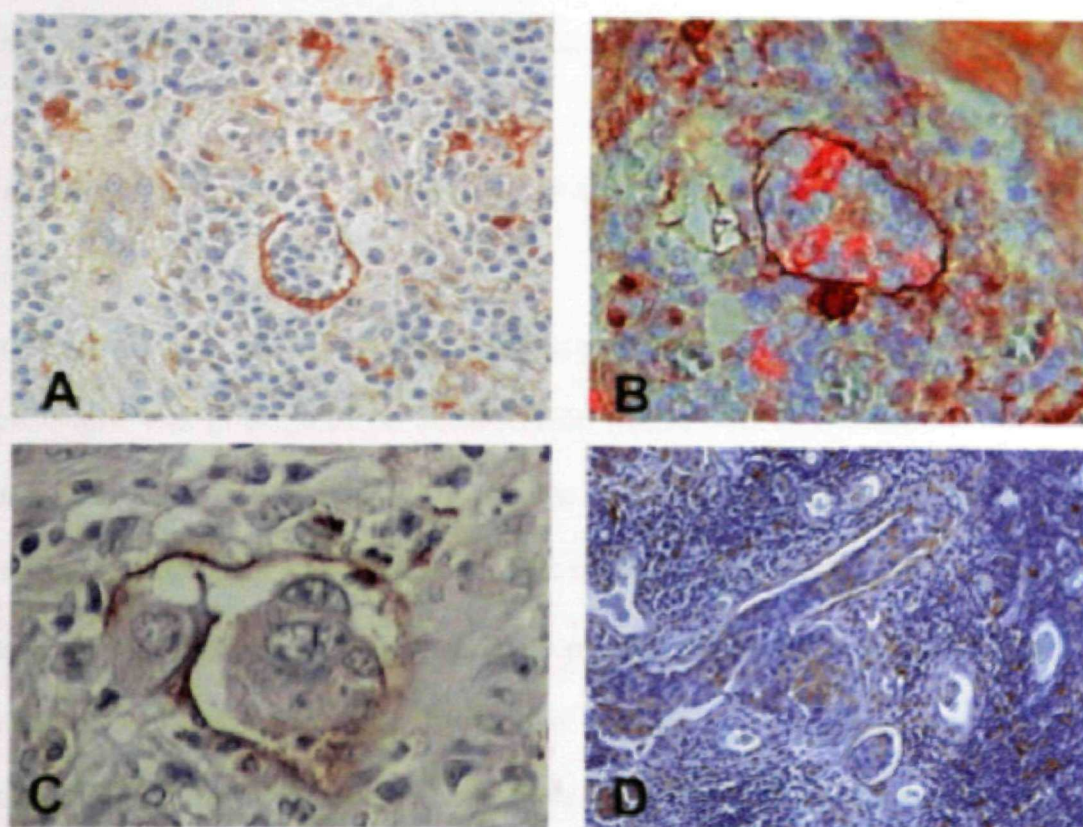


Figura 2

los leucocitos y las células presentadoras de antígeno (Fig 2 C y D), posiblemente involucrando también quimiocinas y moléculas de adhesión, con objeto de conseguir acceder a los vasos linfáticos (Alitalo K, et al. 2002; Lohela M, et al. 2003).

En vista de estas importantes funciones, no es sorprendente que las alteraciones en el crecimiento o función del sistema linfático estén implicados en numerosas enfermedades como: el linfedema, la inflamación-infección, ciertas enfermedades inmunitarias y el cáncer (Karpanen T, et al. 2001; Pepper MS, 2001).

7.6 IMPLICACIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO EN EL CÁNCER

Las metástasis son la causa principal de muerte por cáncer (Hanahan D, et al. 2000). Existen cuatro vías principales de diseminación neoplásica: 1) la invasión local, 2) la siembra directa en las cavidades corporales (peritoneo, pleura, pericardio), 3) la diseminación hematológica y 4) la diseminación linfática (Pepper MS, 2001). Los tumores malignos de estirpe mesenquimal o epitelial, pueden metastatizar por alguno de estos mecanismos, sin embargo, mientras que los primeros suelen diseminarse por vía hematológica, los últimos lo hacen fundamentalmente por vía linfática a los ganglios linfáticos regionales (Sleeman JP, 2000; Pepper MS, 2001;). Este sería el caso del carcinoma epidermoide laringofaríngeo.

Como hemos visto con anterioridad, la afectación ganglionar es actualmente el mejor factor predictivo de la evolución clínica del LSCC. La presencia de células tumorales en los ganglios linfáticos regionales es un factor de gran relevancia para la estadificación de los tumores humanos y constituye la base para las diferentes modalidades terapéuticas (Stacker SA ,et al. 2002).

Para el proceso metastásico se requieren múltiples respuestas moleculares y celulares que se inician por la combinación de varios estímulos. Se piensa que el proceso secuencial de producción de metástasis comprende los pasos siguientes:

1. Inducción de angiogénesis y/o linfangiogénesis.
2. Desprendimiento de células o grupos de células del tumor primario y acceso de éstas a los vasos linfáticos o sanguíneos.
3. Supervivencia en la circulación.
4. Detención-fijación específica o al azar en la microvascularización de los órganos diana.
5. Salida de los vasos.
6. Crecimiento e invasión en estos órganos diana para formar el foco metastásico (He Y, et al. 2004).

El sistema linfático parece ser una vía excelente para la diseminación neoplásica porque:

- a) Los linfáticos iniciales son mucho mayores que los capilares sanguíneos, tienen una membrana basal discontinua y sus uniones interendoteliales son más laxas (Leak I.V, 1976).
- b) La velocidad y el estrés mecánico del flujo en el sistema linfático es mucho menor que en el torrente sanguíneo.
- c) La composición de la linfa es muy similar a la del fluido intersticial y es capaz de facilitar la viabilidad celular (Pepper MS, 2001; Sleeman JP, et al. 2001; Swartz MA, et al. 2001; Skobe M, et al. 2001).

La gran mayoría de los tumores malignos de cabeza y cuello son de origen epitelial y su progresión tumoral, una vez que el epitelio normal se ha transformado en neoplásico, evoluciona de carcinoma *in situ*, a carcinoma microinvasor, carcinoma invasor, hasta llegar al carcinoma con invasión profunda y metástasis.

En este trabajo se han estudiado la influencia de la presencia de vasos linfáticos iniciales intratumorales (linfangiogénesis intratumoral) y de la expresión del VEGF-C en dos fases distintas de la progresión tumoral del carcinoma epidermoide laringofaríngeo. Para ello se han dividido los pacientes de la muestra global en dos grupos: los pacientes del grupo N(0) (ausencia de metástasis ganglionares), que representan una fase más inicial en la progresión tumoral frente a los pacientes del grupo N(+) (presencia de metástasis ganglionares), que constituyen la fase más avanzada.

En el grupo N(0), la presencia de linfangiogénesis intratumoral (LIT) de bajo grado y la expresión del VEGF-C se comportaron como factores pronósticos independientes del acortamiento del tiempo libre de enfermedad, en forma de recidiva ganglionar cervical. Estos factores, sin embargo, no influyeron en la supervivencia global de este grupo, probablemente porque la detección precoz de la recidiva en estos pacientes posibilitó un tratamiento quirúrgico efectivo (Tablas 4 y 5).

En el grupo N(+), ni la presencia ni el tipo de LIT [el 76% de los pacientes N(+) muestran LIT frente al 46% los pacientes N(0)] ni la expresión del VEGF-C influyeron en ningún aspecto de la enfermedad, posiblemente porque más de la mitad de los pacientes en este grupo tenían linfáticos intratumorales y, por lo tanto, no constituyen un factor diferenciador. Además, la presencia de metástasis ganglionares cervicales, hace de este grupo una entidad diferente a los casos sin adenopatías, en donde la propia enfermedad metastásica ganglionar es el único factor pronóstico (Tablas 9 y 10)

7.7 PAPEL DEL VEGF-C EN LA BIOLOGÍA TUMORAL

Existen datos acerca de la expresión del VEGF-C en diferentes tumores humanos: mama (Kurebayashi J, et al. 1999; Salven P, et al. 1998); colon (Akagi K, et al. 2000; Andre T,

et al. 2000); pulmón (Salven P, et al. 1998; Niki T, et al. 2000; Ohta Y, et al. 2000), tiroides (Bunone G, et al. 1999; Fellmer PT, et al. 1999; Shushanov S, et al. 2000), estómago (Yonemura Y, et al. 1999); carcinomas de células escamosas (Salven P, et al. 1998); mesoteliomas (Ohta Y, et al. 1999); neuroblastoma (Eggert A, et al. 2000); sarcomas y melanomas (Salven P, et al. 1998); carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello de distintas localizaciones (Beasley NJP, et al. 2002; O-Charoenrat P, et al. 2001; Neuchrist C, et al. 2003) e incluso específicamente en laringe (Homer JJ, et al. 2001); hipofaringe (Homer JJ, et al. 2003). En este estudio también obtenemos expresión del VEGF-C en el cancer laringofaríngeo. En la mayoría de los estudios, se han correlacionado significativamente los niveles del VEGF-C en el tumor primario con la invasión vascular linfática y/o las metástasis a los ganglios linfáticos en los siguientes tumores: carcinoma de tiroides (Tanaka K, et al. 2002 (a); Tanaka K, et al. 2002 (b); Bunone G, et al. 1999); carcinoma escamoso de esófago (Kitadai Y, et al. 2001); adenocarcinoma de estómago (Ishikawa M, et al. 2003; Yonemura Y, et al. 1999; Takahashi A, et al. 2002; Amioka T, et al. 2002); carcinoma de mama (Kurchayashi J, et al. 1999); carcinoma de cérvix (Hashimoto I, et al. 2001; Ueda M, et al. 2002); carcinoma de pulmón (Kajita T, et al. 2001; Ohta Y, et al. 2000); carcinoma de páncreas (Tang RF, et al. 2001); carcinoma de endometrio (Hirai M, et al. 2001); carcinoma de vesícula biliar (Nakashima T, et al. 2003); carcinoma de próstata (Tsurusaki T, et al. 1999); carcinoma colorectal (Kaio E, et al. 2003; Akagi K, et al. 2000; Furudoi A, et al. 2002); carcinoma escamoso de cabeza y cuello (O-Charoenrat P, et al. 2001); hipofaringe (Homer JJ, et al.2003). Otros autores no encontraron relación entre los niveles del VEGF-C en el tumor primario y la presencia de metástasis ganglionares linfáticas: en estómago (Kabashima A, et al. 2001); carcinoma de mama (Yang W, et al. 2002; Gunningham SP, et al. 2000); carcinoma de pulmón (Arinaga M, et al. 2003);

mesotelioma (Ohta Y, et al. 1999); neuroblastoma (Komuro K, et al. 2001), carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Neuchrist C, et al. 2003).

Como vemos, existe una gran cantidad de datos disponibles sobre la expresión del VEGF-C en diversos tumores humanos y su relación con las metástasis ganglionares linfáticas. Entonces surge la pregunta sobre cuál es la función del VEGF-C en el proceso metastásico a los ganglios regionales. La contestación a esta pregunta la dieron los resultados obtenidos en diversos estudios experimentales (Mandriota SJ, et al. 2001(a); Stacker SA, et al. 2001; Skobe M, et al. 2001(b); Mattila MM, et al. 2002; Padera TP, et al. 2002; He Y, et al. 2002; Krishnan J, et al. 2003) que demostraron que el VEGF-C induce la aparición de linfangiogénesis en el tumor primario y ésta, a su vez, promueve el desarrollo de metástasis a los ganglios linfáticos. La inducción de la linfangiogénesis conduce al aumento de la densidad vascular linfática tumoral mediante la neoformación de vasos linfáticos iniciales intra y/o peritumorales que se suman a los linfáticos preexistentes. De esta forma se incrementa el número de células tumorales en contacto con el endotelio linfático, lo que crea un número mayor de oportunidades para que estas células puedan abandonar el tumor primario. Algunos autores piensan que el VEGF-C puede tener otras funciones que favorezcan la diseminación metastásica, además de la exclusivamente linfangiogénica. Es posible que el VEGF-C pueda activar el endotelio linfático para que secreta quimiocinas o sustancias parecidas que atraigan a las células tumorales y faciliten su entrada en los vasos linfáticos iniciales. Así, incluso cuando el tumor mismo carece de vasos linfáticos intratumorales, como en el modelo de carcinoma de páncreas con expresión de VEGF-C (Mandriota SJ, et al. 2001), la activación de los linfáticos peritumorales explicaría el incremento de las metástasis. Otras funciones atribuidas al VEGF-C son la inducción de angiogénesis (Skobe M, et al. 2001), el aumento de la permeabilidad vascular y la quimiotaxis macrofágica (Lohela M, et al.

2003). Las dos primeras favorecerían la diseminación metastásica a través de un aumento de la presión intersticial tumoral que "forzaria" a las células neoplásicas a entrar en los vasos, tanto sanguíneos como linfáticos. La quimiotaxis de los macrófagos y su atracción hacia la periferia tumoral, se piensa que favorecería el proceso metastásico por medio de la fuente suplementaria del VEGF-C que aportan los macrófagos. Los distintos efectos biológicos del VEGF-C en los diferentes tumores probablemente dependan del tipo de procesamiento proteolítico que las células tumorales hacen de esta molécula (Skobe M, et al. 2001).

Aunque investigaciones recientes llevadas a cabo en pacientes con cáncer colorrectal (Jia YT, et al. 2004) y con carcinoma oral (Sedivy R, et al. 2003) sugieren que la expresión del VEGF-C podría inducir la aparición de linfangiogénesis en tumores humanos, todavía no se ha demostrado que promueva la linfangiogénesis en los tumores humanos y que ésta sea la causa del aumento de la incidencia de metástasis ganglionares linfáticas (Alitalo K, et al. 2002; Lohela M, et al. 2003; Nathanson SD, 2003). Hacen falta más estudios para establecer la forma en que esto ocurre y su importancia real en los tumores humanos. Nosotros en este estudio y al igual que (Beasley NJP, et al 2002), no hemos encontrado relación significativa entre la expresión del VEGF-C y la presencia de LIT ($P=0.143$), aunque sí parece que puede existir una tendencia a presentar mayor cantidad de linfáticos iniciales intratumorales cuando se expresa el VEGF-C. La expresión del VEGF-C tampoco influyó de manera estadísticamente significativa en la supervivencia global de los pacientes de esta muestra, aunque sí lo hizo en el acortamiento del tiempo libre de enfermedad y en la mayor incidencia de recidivas ganglionares. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por (Neuchrist C, et al. 2003 y O- Charoenrat P, et al. 2001).

7.8 LINFANGIOGÉNESIS TUMORAL

El término linfangiogénesis hace referencia al desarrollo y proliferación de nuevos vasos linfáticos a partir de los vasos del huésped. La proliferación de nuevos vasos linfáticos iniciales sucede en el embrión, en la reparación tisular, en los procesos inflamatorios, en las infecciones parasitarias y en los tumores (Nathanson SD, 2003).

Existe mucha controversia sobre el papel de la linfangiogénesis en el cáncer. Hasta fechas recientes se pensaba que la linfangiogénesis no tenía lugar en el cáncer y que la mayoría de los tumores carecían de vasos linfáticos (Folkman J, 1996; Leu AJ, et al. 2000; Jain RK, et al. 2002; Carmeliet P, et al. 2000). La identificación de marcadores específicos del endotelio linfático y de sus factores de crecimiento ha hecho posible la revisión de estos conceptos. Hasta el momento sólo se ha observado la presencia de vasos linfáticos intratumorales en tumores experimentales (Papoutsi M, et al. 2000; Papoutsi M, et al. 2001; Skobe M, et al. 2001(a); Skobe M, et al. 2001(b); Karpanen T, et al. 2001; Stacker SA, et al. 2001; Mattila MM, et al. 2002; Padera TP, et al. 2002; He Y, et al. 2002) y en unos pocos tumores humanos como el cáncer de cabeza y cuello de diversas localizaciones (Beasley NJP, et al. 2002; Muñoz-Guerra MF, et al. 2004), incluido el carcinoma laringofaríngeo, como comprobamos en este estudio, y en el melanoma primario (Straume O, et al. 2003). Por el contrario, no se han observado linfáticos intratumorales en otros tumores experimentales (Mandriota SJ, et al. 2001; Krishnan J, et al. 2003) ni en tumores humanos como el carcinoma de cérvix (Birner P, et al. 2001), carcinoma de ovario (Birner P, et al. 2000), melanoma cutáneo (De Waal RM, et al. 1997), melanoma uveal (Clarijs R, et al. 2001) y cáncer hepático (Carreira CM, et al. 2001). Es probable que los tumores se muestren heterogéneos con respecto a la presencia o ausencia de linfangiogénesis intratumoral (Alitalo K, et al. 2002). Todavía se

mantiene abierta la pregunta sobre si la linfangiogénesis es un hecho común durante la carcinogénesis, o si se limita únicamente a determinados tipos de cáncer o de estadios tumorales. En el futuro se requerirán más estudios para determinar si los linfáticos intratumorales están restringidos sólo a determinados tipos de cáncer y para saber si su presencia en los tumores tiene algún significado pronóstico. A este respecto se han publicado ya algunos trabajos, como por ejemplo el de (Muñoz-Guerra MF, et al. 2004), en el que la presencia de linfangiogénesis intratumoral en el carcinoma oral inicial se asoció de forma significativa a la recurrencia de la enfermedad. Para (Beasley NJP, et al. 2002) una elevada densidad linfática intratumoral se relacionó con la existencia de metástasis ganglionares cervicales en el carcinoma de orofaringe, pero no en el de cavidad oral, ni en el de laringe. En el caso de (Straume O, et al. 2003) la presencia de linfangiogénesis intratumoral de bajo grado se asoció significativamente con la aparición de recidivas ganglionares y con un acortamiento del periodo libre de enfermedad.

El papel de los linfáticos intratumorales en la diseminación tumoral es objeto de discusión (Jain RK, et al. 2002; Padera TP, et al. 2002). Esto se debe a que los vasos linfáticos tumorales que se han identificado utilizando marcadores específicos del endotelio linfático no se pudieron detectar luego mediante linfangiografía. Con base en estos hechos, algunos autores han llegado a la conclusión que los tumores no tienen vasos linfáticos funcionales en su interior y que, por tanto, las células tumorales no pueden utilizar esta vía para llegar a los ganglios linfáticos regionales (Ryan TJ, 1989). Sin embargo, otros piensan que el funcionamiento adecuado de los vasos linfáticos iniciales con respecto a la captación eficiente de fluidos y macromoléculas puede que no sea tan importante para el proceso de diseminación tumoral, debido a que la captación y el transporte de fluidos y macromoléculas del intersticio a los vasos linfáticos iniciales probablemente no estén gobernados por los mismos principios que el transporte celular

en general y de las células tumorales en particular (Jain RK, 1990). A este respecto, algunos autores hacen referencia a un posible papel activo en la producción de metástasis ganglionares con la participación, al menos, del VEGF-C. Existen datos experimentales que sugieren que las células endoteliales linfáticas podrían "atraer" a las células tumorales mediante la secreción de quimiocinas y que, por tanto, promoverían de forma activa las metástasis linfáticas (Cassella M, et al. 2002; Muller A, et al. 2001; Wiley HH, et al. 2001). Otros, sin embargo, abogan por un modelo "pasivo" de metástasis tumorales (Sugino T, et al. 2002). Es probable que las metástasis a los ganglios linfáticos cervicales se deban a una combinación de ambos procesos, activos y pasivos.

En relación a la densidad vascular linfática, varios autores refieren la existencia de una asociación entre el número de linfáticos asociados al tumor y la presencia de metástasis ganglionares para un tipo tumoral determinado, de tal forma que cuanto mayor es la cantidad de vasos linfáticos, mayor es la incidencia de metástasis, y, por tanto, peor es el pronóstico, como se deduce de los datos publicados en los siguientes trabajos: cáncer de pulmón (Niki T, et al. 2001); cáncer endometrial (Yokohama Y, et al. 2000); cáncer gástrico (Yonemura Y, et al. 2001); cáncer escamoso de lengua (Okamoto M, et al. 2002); carcinoma escamoso de orofaringe (Beasley NJP, et al. 2002); cáncer de cérvix (Schoppmann SF, et al. 2001(b); Birner P, et al. 2001); cáncer de mama (Nathanson SD, et al. 2000; Schoppmann et al. 01(a)). En nuestro trabajo la presencia linfangiogénesis intratumoral de bajo grado, se relacionó significativamente con la recidiva ganglionar cervical y con la disminución del tiempo libre de enfermedad, frente a los pacientes con ausencia de linfangiogénesis y, de forma sorprendente, frente a aquellos pacientes con linfangiogénesis intratumoral de alto grado. Aunque intuitivamente cabe pensar que cuanto mayor sea la densidad vascular linfática peor va a ser el pronóstico, ya que las células tumorales tienen más posibilidades para escapar del tumor primario y de llegar a

los ganglios linfáticos, esto no tiene porqué ser necesariamente así. En los trabajos de (Straume O, et al. 2003) en melanoma cutáneo y de (Birner P, et al. 2001) en carcinoma de cérvix, el aumento de la densidad vascular linfática se asoció a un pronóstico favorable. La interpretación de estos resultados estaría en relación con la mejor respuesta inmunitaria que el aumento de la densidad linfática proporcionaría al huésped frente a las células tumorales. Apoyando esta idea, Straume et al. refieren que los casos de elevada densidad vascular linfática se asocian con frecuencia a un aumento del infiltrado linfocitario. En este estudio hemos observado que la linfangiogénesis de alto grado también se asociaba a un intenso infiltrado inflamatorio. Pensamos que este infiltrado podría actuar como una fuente suplementaria de VEGF-C que aumentaría la permeabilidad vascular incrementando la presión intersticial tumoral. Esto forzaría a algunas células tumorales, al azar, a entrar en los vasos linfáticos iniciales de manera pasiva. Por el contrario, en los casos de linfangiogénesis de bajo grado podría predominar un reclutamiento activo de las células tumorales por el endotelio de los vasos linfáticos iniciales, frente a los mecanismos pasivos. Serán necesarios estudios posteriores que demuestren esta hipótesis.

Es evidente que el proceso metastásico es una compleja sucesión de pasos e interacciones entre las características del tumor primario y las del huésped, en el que la linfangiogénesis y la secreción del VEGF-C son sólo una parte, probablemente necesaria, pero no suficiente (He Y, et al. 2004). En este estudio se pone de manifiesto la importancia de estos factores en la recidiva ganglionar cervical en los en estadios de la progresión tumoral anteriores a la aparición de metástasis ganglionares. En un futuro sería conveniente la realización de más estudios que confirmen estos resultados y que valoren su aplicación en biopsias diagnósticas con objeto de identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar recidivas ganglionares. Esto permitiría seleccionar de

forma más precisa la estrategia terapéutica más adecuada para curar la enfermedad y evitar el sobretratamiento.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. El antígeno PA2.26 es un marcador del endotelio de los vasos linfáticos iniciales intratumorales y permite diferenciarlos con seguridad de los vasos sanguíneos.
2. El carcinoma epidermoide laringofaríngeo presenta vasos linfáticos iniciales intratumorales con signos morfológicos de linfangiogénesis intratumoral (LIT).
3. Las células del carcinoma epidermoide laringofaríngeo expresan VEGF-C.
4. La presencia de linfangiogénesis intratumoral (LIT) de bajo grado y la expresión del VEGF-C en el carcinoma epidermoide laringofaríngeo sin metástasis ganglionares (N0), son factores predictivos independientes de la probabilidad de recidiva ganglionar cervical y del acortamiento del período libre de enfermedad.
5. En el carcinoma laringofaríngeo con metástasis ganglionares (N⁺), ni la presencia de LIT ni la expresión del VEGF-C influyen en la enfermedad, probablemente porque las adenopatías metastásicas son el único factor pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br. J. Cancer*. 2000; 83: 887-891.
- Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002; 1: 219-227.
- Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur. J. Cancer*. 2002; 38: 1413-1419.
- Andre T, Kotelevets L, Vaillant JC, et al. Vegf, Vegf-B, Vegf-C and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa. *Int. J. Cancer*. 2000; 86: 174-181.
- Arinaga M, Noguchi T, Takeno S, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 457-464.
- Banerji S, Ni J, Wang SX, et al. LYVE-1 a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Cell Biol*. 1999; 144:789-801.
- Barona de Guzman R, Martorell MA, Basterra J, et al. Analysis of DNA content in supraglottic epidermoid carcinoma. *Otolaryngol. Head Neck Surg*. 1993; 108: 706-710.
- Barona de Guzman R, Martorell MA, Basterra J, et al. Prognostic value of histopathological parameters in 51 supraglottic squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 1993; 103:538-540.
- Beasley NJP, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2002; 62: 1315-1320.
- Bennett SH, Futrell JW, Roth JA, et al. Prognostic significance of histologic host

response in cancer of the larynx or hypopharynx. *Cancer* 1971; 28: 1255-1265.

- Berlinger NT, Tsakraklides V, Pollak K, et al. Immunologic assessment of regional lymph node histology in relation to survival in head and neck carcinoma. *Cancer* 1976; 37: 697-700.
- Berrino F, Capocaccia R, Esteve J. Survival of cancer patients in Europe. The EURO CARE-II Study. IARC Scient. Publ. No. 151. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1999.
- Berrino F, Gatta G. Variation in survival of patients with head and neck cancer in Europe by site of origin of the tumours. EURO CARE Working Group. *Eur. J. Cancer* 1998; 34:54-61.
- Birner P, Obermair A, Schindl M, et al. selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessels reveals independent prognostic influence of blood and lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 93-97.
- Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Lymphatic microvessel density as a novel prognostic factor in early-stage invasive cervical cancer. *Int J. Cancer.* 2001; 95: 23-33.
- Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res.* 2000; 20: 2981-2985.
- Breiteneder-Geleff S, Solciman A, Kowalski H, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am.J.Pathol.* 1999; 154:385-394.
- Bunone G, Vigneri T, Mariani L, et al. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am. J. Pathol.* 1999; 155: 1967-1976.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*; 407: 249-257.
- Carreira CM, Nasser SM, di Tomaso E, et al. LYVE-1 is not restricted to the lymph

vessels: expresión in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res.* 2001; 61: 8079-8084.

- Carter RL, Bliss JM, Soo KC, et al. Radical neck dissections for squamous cell carcinomas: Pathological findings and their clinical implications with particular reference to transcapsular spread. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1987;13: 825-837.
- Carter RL, Tanner NSB, Clifford P, et al. Perineural spread in squamous cell carcinomas of the head and neck: A clinicopathologic study. *Clin Otolaryngol.* 1979; 4: 271-281.
- Casley-Smith JR, Florey HW. The structure of normal small lymphatics. *Q. J. Exp. Physiol.* 1961; 46: 101.
- Cassella M, Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 979: 120-130.
- Clarijs R, Ruiter DJ, de Waal RM. Lymphangiogenesis in malignant tumours: does it occur? *J. Pathol.* 2001; 193: 143-146.
- Clarijs R, Schalkwijk K, Ruiter DJ, et al. Lack of lymphangiogenesis despite coexpression of VEGF-C and its receptor flt-4 in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2001; 42(7): 1422-1428.
- Cornford ME, Oldendorf WH. Terminal endothelial cells of the lymph capillaries as active transport structures involved in the formation of lymph in rat skin. *Lymphology* 1993; 26: 67-78.
- Daroczy J. The dermal lymphatic capillaries. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- de Waal RM, van Altena MC, Erhard H, et al. Lack of lymphangiogenesis in human primary cutaneous melanoma. Consequences for the mechanism of lymphatic dissemination. *Am. J. Pathol.* 1997; 150(6): 1951-1957.
- Decker JW, Price JC, Goldstein JC. Advanced laryngeal cancer: Relevance of

pathologic stage to survival and therapy. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1986; 112: 1163-1167.

- Dickman PW, Hakulinen T, Luostarinen T, et al. Survival of cancer patients in Finland 1955-1994. *Acta Oncol.* 1999; 38(Suppl 12): 1-103.
- Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, et al. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:1900-1908.
- Eiband JD, Elias EG, Suter CM. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Am. J. Surg.* 1989; 158: 314-317.
- Esteve J, De Angelis G, Verdecchia A. Trends in cancer survival probability over the period 1978-1989, In Berrino F, Capocaccia R, Esteve J, et al., editors. *Survival of Cancer Patients in Europe. The EUROCORE-II Study.* Lyon: IARC Scient. Publ. No. 151, 1999.
- European Network of Cancer Registries. EUROCIM (European Cancer Incidence and Mortality). Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1997.
- Fellmer PT, Sato K, Tanaka R, et al. Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Surgery.* 1999; 126: 1056-1061.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, et al. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0 IARC Cancer Base No. 5. Lyon: IARC Press, 2001.
- Ferlay J, Bray F, Sankila R, et al. EUCAN: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence in the European Union 1998, version 4.0. IARC Cancer Base No 4. Lyon, IARC Press, 1999.
- Ferlito A, Harrison DFN, Bailey BJ, et al. Are clinical classifications for laryngeal cancer satisfactory? *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1995; 104: 741-747

- Flein DA, Mendenhall WM, Parsons JT, et al. T1-T2 squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiotherapy: a multivariate analysis of variables potentially influencing local control. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1993; 25: 605-611
- Folkman J. Angiogenesis and tumor growth. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 921.
- Foote RL, Buskirk SJ, Stanley RJ, et al. Patterns of failure after total laryngectomy for glottic carcinoma. *Cancer* 1989; 64: 143-149.
- Franchi A, Gallo O, Boddi V, et al. Prediction of occult neck metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin. Immunohistochemical determination. *Clin Cancer Res.* 1996; 2: 1801-1808.
- Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology.* 2002; 62: 157-166.
- Gale NW, Thurston G, Hackett, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002; 3: 411-423.
- Galioto GB, Mevio E, Benazzo M, et al. Prognostic parameters in metastatic spread of laryngeal cancer: Clinico-histopathological correlations. *Clin. Otolaryngol.* 1987; 12: 303-308.
- Gallo O, Libonati GA, Gallina E, et al. Langerhans cells related to prognosis in patients with laryngeal carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1991; 117: 1007-1010.
- Gerli R, Ibba L, Fruschelli C. Ultrastructural cytochemistry of anchoring filaments of human lymphatic capillaries and their relation to elastic fibers. *Lymphology* 1991; 24: 105-112.
- Ghouri AF, Zamora RL, Sessions DG, et al. Prediction of occult neck disease in laryngeal cancer by means of a logistic regression statistical model. *Laryngoscope.*

1994; 104: 1280-1284.

- Giraudo E, Primo L, Audero E, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(34): 22128-22135.
- Goldsmith MM, Belchis DA, Cresson DH, et al. The importance of the eosinophil in head and neck cancer. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1992; 106: 27-33.
- Goldsmith MM, Cresson DS, Postma DS, et al. significance of ploidy in laryngeal cancer. *Am. J. Surg.* 1986; 152: 396-402.
- Graem N, Helweg-Larsen K, Keiding N. precision of histological grading of malignancy: Sources of variation in a histological scoring system for grading cancer of the larynx. *Acta Pathol. Microbiol Scand.* 1980; 88: 307-310.
- Gunningham SP, Currie MJ, Han C, et al. The short form of the alternative spliced flt-4 but not its ligand vascular endothelial growth factor C is related to lymph node metastasis in human breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 4278-4286.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Hashimoto I, Kodama J, Seki N, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br. J. Cancer.* 2001; 85: 93-97.
- He Y, Kerpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2004; 1654: 3-12.
- He Y, Kozaki K, Karpanen T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94: 819-825.
- Hirabayashi H, Koshii K, Uno K, et al. Extracapsular spread of squamous cell carcinoma in neck lymph nodes: Prognostic factor of laryngeal cancer. *Laryngoscope*

1991; 101: 502-506.

- Hirai M, Nakagawara A, Oosaki T, et al. Expression of vascular endothelial growth factors (VEGF-A/VEGF-1 and VEGF-C/VEGF-2) in postmenopausal uterine endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2001; 80: 181-188.
- Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in early laryngeal cancer: relationship with radioresistance. *Clin. Otolaryngol.* 2001; 26: 498-504.
- Homer JJ, Prentice MG, Cawkwell L, et al. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factors A and C in squamous cell carcinoma of the piriform fossa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 129: 1110-1114.
- Huntington GS, McClure CFW. The anatomy and development of the jugular sac in the domestic cat (*Felis domestica*). *Anat. Rec.* 1908; 2: 1-19.
- Iljin K, Petrova TV, Veikkola T, et al. A fluorescent Tie 1 reporter allows monitoring of vascular development and endothelial cell isolation from transgenic mouse embryos. *FASEB J.* 2002; 16(13): 1764-1774.
- Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2003; 33: 21-27.
- Jain RK, Fenton BT. Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *Natl. Cancer Inst.* 2002; 94: 417-421.
- Jain RK. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metast. Rev.* 1990; 9: 253-266.
- Jia YT, Li ZX, He YT, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C and the relationship between lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2004; 10 (22): 3261-3263.

- Jones N, Iljin K, Dumont DJ, et al. Tie receptors: New modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2(4): 257-267.
- Joukov V, Kumar V, Sorsa T, et al. A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(12): 6599-6602.
- Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev.* 2002; 82: 673-700.
- Jussila L, Valtola R, Partanen TA, et al. Lymphatic endothelium and kaposi's sarcoma spindle cells detected by antibodies against the vascular endothelial growth factor receptor -3. *Cancer Res.* 1998; 58: 1599-1604.
- Kabashima A, Machara Y, Kakeji Y, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma. *Oncology.* 2001;60: 146-150.
- Kaio E, Tanaka S, Kitadai, et al. Clinical significance of angiogenic factor expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology.* 2003;64: 61-73.
- Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the FMS - like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 3566-3570.
- Kajita T, Ohta Y, Kimura K, et al. The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in nonsmall cell lung cancer. *Br. J. Cancer.* 2001; 85: 255-260.
- Kamijo T, Yokose T, Hasebe T, et al. Image analysis of microvessel surface area predicts radiosensitivity in early-stage laryngeal carcinoma treated with radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 2809-2814.
- Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, et al. Missense mutations interfere with

VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat. Genet.* 2000; 25(2):153-159

- Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, et al. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98(22): 12677-12682.
- Karpanen T, Alitalo K. Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J. Exp. Med.* 2001; 194: 37-42.
- Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res.* 2001; 61: 1786-1790.
- Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer.* 2001; 93: 662-666.
- Kleinsasser O. Revision of classification of laryngeal cancer: Is it long overdue? (Proposals for an improved TN-classification). *J.Laryngol. Otol.* 1992; 106: 197-204.
- Komuro H, Kaneko S, Kaneko M, et al. Expression of angiogenic factors and tumor progression in human neuroblastoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2001; 127: 739-743.
- Kowalsky LP, Franco EL, de Andrade Sobrinho J. Factors influencing regional lymph node metastasis from laryngeal carcinoma. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1995; 104: 442-447.
- Kowalsky LP, Franco EL, de Andrade Sobrinho J. Prognostic factors in laryngeal cancer patients submitted to surgical treatment. *J. Surg. Oncol.* 1991; 48: 87-95.
- Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M et al. Isolation and characterization of termal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med.* 2001; 194:797-808.
- Krishnan J, Kirkin V, Steffen A, et al. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in tumors and its

- relationship to lymphatic metastasis in immunocompetent rats. *Cancer Res.* 2003; 63: 713-722.
- Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 1999; 90: 977-981.
 - Lam KH, Lau WF, Wei WI. Tumor clearance at resection margins in total laryngectomy: A clinicopathologic study. *Cancer* 1988; 61:2260-2272.
 - Leak LV. The structure of lymphatic capillaries in lymph formation. *Fed. Proc.* 1976; 35: 1863-1871.
 - Leak RV. Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue-lymph interface. *Microvasc. Res.* 1970; 2: 361-391.
 - Lee WR, Mancuso AA, Saleh EM, et al. Can pretreatment computed tomography findings predict local control in T3 squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiotherapy: a multivariate analysis of variables potentially influencing local control. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1993; 25: 683-687.
 - Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, et al. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.* 2000; 60: 4324-4327.
 - Llácer A. Años potenciales de vida perdidos por causa 1989-1998. Centro Nacional de Epidemiología. 2002. cne.isciii.es/mortal/APVPcau8998.htm.
 - López Abente G(b), Pollán M, Aragonés N et al.. Plan Integral del Cáncer: situación del cáncer en España. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Dic. 2003.
 - López-Abente G(a), Pollán M, Aragonés N, et al. Informe sobre la salud de los españoles. Cáncer. Información disponible a dic. 03. Área de epidemiología ambiental y cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.

<http://cne.isjil.es>

- Lund C, Jorgensen K, Hjelm-Hansen M, et al. Laryngeal carcinoma. III Treatment results in relation to microscopic score. *Acta Radiol. Oncol. Radiat. Phys. Biol.* 1979;18: 497-508.
- Lutterbach J, Gutterberger R. Anemia is associated with decreased local control of surgically treated squamous cell carcinomas of the glottic larynx. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2000; 48: 1345-1350.
- Makinen T, Jussila L, Veikkola, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat. Med.* 2001; 7: 199-205.
- Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transducer growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.* 2001; 20: 4762-4773.
- Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* 2001; 20:672-682.
- Manni JJ, Terhaard CHJ, de Boer MF, et al. Prognostic factors for survival in patients with T3 laryngeal carcinoma. *Am. J. Surg.* 1992; 164: 682-687.
- Martín-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, et al. Characterization of human PA2.26 antigen (T1 α -2, podoplanin). A small membrane mucin induced inoral squamous cell carcinomas *Int J Cancer* 2004; 113: 899-910.
- Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, et al. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int. J. Cancer* 1993; 55: 580-585.
- Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, et al. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumor. *Int J Cancer.* 2002;

98: 946-951.

- Maurizi M, Scambia G, Benodetti Panici P, et al. EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: Correlation With clinico-pathological features and prognostic significance. *Int. J. Cancer* 1992; 52: 862-866.
- McGavran MH, Bauer WC, Ogura JH. The incidence of cervical lymph node metastases from epidermoid carcinoma of the larynx and their relationship to certain characteristics of the primary tumor: A study based on the clinical and pathological findings for 96 patients treated by primary en bloc laryngectomy and radical neck dissection. *Cancer* 1961; 14: 55-66.
- Micheli A, Francisci S, Krogh V, et al. Cancer prevalence in Italian cancer registry areas: The ITAPREVAL study. ITAPREVAL Working Group. *Tumori* 1999; 85:309-369.
- Miyaguchi M, Olofsson J, Hellquist HB. Expression of epidermal growth factor receptor in glottic carcinoma and its relation to recurrence after radiotherapy. *Clin. Otolaryngol.* 1991; 16: 466-469.
- Muller, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56.
- Munck-Wikland E, Fernberg J-O, Kuylensstierna R, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression and nuclear DNA content in predicting recurrence after radiotherapy of early glottic cancer. *Eur. J. Cancer* 1993; 29:75,
- Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Martín-Villar E, et al. Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. A study of the early stages. *Cancer*. 2004; 100:553-560.
- Nadal A, Campo E, pinto J, et al. p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium: Absence of correlation with prognostic factors. *J. Pathol.* 1995;

175: 181-188.

- Nakashima T, Kondoh S, Kitoh H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human gallbladder cancer and its relationship to lymph node metastasis. *Int. J. Mol. Med.* 2003; 11: 33-39.
- Nathanson SD, Zarbo RJ, Wachna DL et al. Microvessels that predict axillary lymph node metastases in patients with breast cancer. *Arch. Surg.* 2000; 135: 586-593; discussion 593-594.
- Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer.* 2003; 98: 413-423.
- Nerlich AG, Schleicher E. Identification of lymph and blood capillaries by immunohistochemical staining for various basement membrane components. *Histochemistry.* 1991; 96: 449-453.
- Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck.* 2003; 25: 464-474.
- Nguyen-Tan PF, Le QT, Quivey JM, et al. Treatment results and prognostic factors of advanced T3-T4 laryngeal carcinoma: The University of California, San Francisco (UCSF) and Stanford University Hospital (SUH) experience. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001; 50: 1172-1180.
- Niki T, Iba S, Tokunou M, et al. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6: 2431-2439.
- Niki T, Iba S, Yamada T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 in blood and lymphatic vessels of lung adenocarcinoma. *J. Pathol.* 2001; 193: 450-457.

- O-Chaoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer*. 2001; 92:556-568.
- Ohta Y, Nozawa H, Tanaka Y, et al. Increased vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor-c and decreased nm23 expression associated with microdissemination in the lymph nodes in stage I non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2000; 119: 804-813.
- Ohta Y, Shridhar V, Bright RK, et al. VEGF and VEGF type C play an important role in angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesothelioma tumours. *Br. J. Cancer*. 1999; 81: 54-61.
- Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, et al. Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of the tongue. *J. Oral pathol. Med.* 2002; 31: 227-233.
- Otsuki Y, Kubo H, Macari S. Immunohistochemical differentiation between lymphatic vessels and blood vessels – use of anti-basement membrane antibodies and antifactor VIII-related antigen. *Arch. Histol. Cytol.* 1990; 53 Suppl: 95-105.
- Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 2002; 296: 1883-1886.
- Papoutsis M, Siemeister G, Weindel K, et al. Active interaction of human A375 melanoma cells with the lymphatics in vivo. *Histochem. Cell Biol.* 2000; 114: 373-385.
- Papoutsis M, Sleeman JP, Wilting J. Interaction of rat tumor cells with blood vessels and lymphatics of the avian chorioallantoic membrane. *Microsc. Res. Tech.* 2001; 55: 100-107.
- Papoutsis M, Tomarev SI, Eichmann A, et al. Endogenous origin of the lymphatics in the avian chorioallantoic membrane. *Dev. Dyn.* 2001; 222(2): 238-251.

- Partanen TA, Arola J, Saaristo A, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *Faseb J.* 2000; 14: 2087-2096.
- Patt BS, Close LG, Vuitch F. Prognostic significance of sinus histiocytosis in metastatic laryngeal cancer. *Laryngoscope* 1993; 103: 498- 502.
- Pera E, Moreno A, Galindo L, et al. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: A multifactorial study of 416 cases. *Cancer* 1986; 58: 928-934.
- Petrova TV, Makinen T, Makela TP, et al. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J.* 2002; 21(17): 4600-4611.
- Pradier R, Gonzalez A, Matos E, et al. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: Experience in 296 male patients. *Cancer* 1993; 71: 2472-2476.
- Reid AP, Robin PE, Powell J, et al. Staging carcinoma: Its value in cancer of the larynx. *J. Laryngol. Otol.* 1991; 105: 456-458.
- Resnick JM, Uhlman D, Nichans GA, et al. Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: Prognostic factors. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1995; 104: 685-694.
- Roland NJ, Caslin AW, Bowie GL, et al. Has the cellular proliferation marker Ki67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck? *Clin. Otolaryngol.* 1994; 19: 13-18.
- Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. *Histology, a text an atlas.* Baltimore: Williams& Wilkins; 1995.
- Russo A, Bazan V, Gebbia N, et al. Flow cytometric DNA analysis and lysosomal Cathepsins B and L in locally advanced laryngeal cancer: Relationship with clinicopathologic parameters and prognostic significance. *Cancer.* 1995; 76:1757-

1764.

- Ryan TJ. Structure and function of lymphatics. *J. Invest. Dermatol.* 1989; 93: 18-24.
- Sabin FR. On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am. J. Anat.* 1902; 1: 367-391.
- Salam MA, Crocker J, Morris A. Over-expression of tumor suppressor gene p53 in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic significance. *Clin. Otolaryngol.* 1995; 20: 49-52.
- Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am. J. Pathol.* 1998; 153: 103-108.
- Sasseti C, Tangemann K, Singer MS, et al. Identification of podocalyxin-like protein an high endothelial venule ligand for I-selection: parallels to CD34. *J Exp Med* 2000; 187:1965-1975.
- Sassler AM, McClatchey KD, Wolf GT, et al. Eosinophilic infiltration in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 1995; 105: 413-416.
- Scambia G, Calozzi L, Panici PB, et al. Expression of ras oncogene p21 protein in normal and neoplastic laryngeal tissues: Correlation with histopathological features and epidermal growth factor receptors. *Br. J. Cancer* 1994; 69: 995-999.
- Schneider M, Othman-Hassan K, Christ B, et al. Lymphangiogenesis in the avian wing bud. *Dev. Dyn.* 1999; 216(4-5): 311-319.
- Scholl FG, Gamallo C, Quintanilla M. Ectopic expression of PA2.26 antigen in epidermal keratinocytes leads to destabilization of adherens junctions and malignant progression. *Lab Invest.* 2000; 80:1749-1759.
- Scholl FG, Gamallo C, Vilaro S et al. Identification of AP2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and

increased motility in keratinocytes. *J Cell Sci.* 1999; 112: 4601-4613.

- Schoppman SF, Birner P, Studer P, et al. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res.* 2001; 21: 2351-2355.
- Schoppman SF, Schindl M, Breiteneder-Geleff S, et al. Inflammatory stromal reaction correlates with lymphatic microvessel density in early-stage cervical cancer. *Anticancer Res.* 2001; 21: 3419-3423.
- Schuller DE, McGuirt WF, McCabe BF, et al. The prognostic significance of metastatic cervical lymph nodes. *Laryngoscope* 1980; 90: 557-570.
- Sedivy R, Beck-Mannagetta J, Haverkamp C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 455-460.
- Shushanov S, Bronstein M, Adelaide J, et al. VEGF-C and VEGFR3 expression in human thyroid pathologies. *Int. J. Cancer.* 2000; 86: 47-52.
- Skobe M, Detmar M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 5: 14-19.
- Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 893-903.
- Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 2001; 7: 192-198.
- Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, et al. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail?. *Microsc Res Tech.* 2001; 55: 61-69.
- Sleeman JP. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res.* 2000; 157: 55-81.

- Snow GB, Annyas AA, Van Slooten EA, et al. Prognostic factors of neck node metastasis. *Clin. Otolaryngol.* 1982; 7: 185-192.
- Snyderman NL, Johnson JT, Schramm VL, et al. Extracapsular spread of carcinoma in cervical lymph nodes: Impact upon survival in patients with carcinoma of the supraglottic larynx. *Cancer* 1985; 56: 1597-1599.
- Soo KC, Shah JP, Gopinath KS, et al. Analysis of prognostic variables and results after supraglottic partial laryngectomy. *Am. J. Surg.* 1988; 156: 301-305.
- Soo KC, Shah JP, Gopinath KS, et al. Analysis of prognostic variables and results after vertical partial laryngectomy. *Am. J. Surg.* 1988; 156: 264-268.
- Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J.* 2002; 16:922-934.
- Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat. Med.* 2001; 7: 186-191.
- Stell PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: Host factors. *Clin. Otolaryngol.* 1990; 15: 111-119.
- Stell PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: Tumour factors. *Clin. Otolaryngol.* 1990; 15: 69-81.
- Straume O, Jackson DG, Akslen LA, et al. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 250-256.
- Sugino T, Kusakabe N, Hoshi N, et al. An invasion-independent pathway of blood-borne metastasis: a new murine mammary tumor model. *Am. J. Pathol.* 2002; 160: 1973-1980.
- Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Microsc Res Tech.* 2001; 55: 92-99.

- Takahashi A, Kono K, Itakura J, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric cancer. *Oncology*. 2002; 62: 121-127.
- Tanaka K, Kurebayashi J, Sonoo H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor family messenger RNA in diseased thyroid tissues. *Surg. Today*. 2002(b); 32: 761-768.
- Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, et al. Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2002(a); 8: 1125-1131.
- Tang RF, Itakura J, Aikawa T, et al. Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer. *Pancreas*. 2001; 22: 285-292.
- Tennvall J, Wennerberg J, Willen R, et al. T3N0 glottic carcinoma: DNA S-phase as a predictor of the outcome after radiotherapy. *Acta Otolaryngol. (Stockh)* 1993; 113: 220-224.
- Thompson AC, Bradley PJ, Griffin NR. Tumor-associated tissue eosinophilia and long-term prognosis for carcinoma of the larynx. *Am. J. Surg*. 1994; 168: 469-471.
- Toffoli G, Franchin G, Barzan L, et al. Prognostic importance of cellular DNA content in T1-T2 N0 laryngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Laryngoscope* 1995; 105: 649-652.
- Truelson JM, Fisher SG, Beals TE. DNA content and histologic growth pattern correlate with prognosis in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx. *Cancer* 1992; 70: 56-62.
- Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br. J. Cancer*. 1999; 80: 309-313.

- Ueda M, Terai Y, Yamashita Y, et al. correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 2002; 98: 335-343.
- Valtola R, Salven P, Heikkilä P, et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 1381-1390.
- Van der Putte SCJ. The development of the lymphatic system in man. *Adv. Anat. Embriol. Cell Biol.* 1975; 51: 3-60.
- Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP, et al. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 1995; 104: 503-510.
- Westerbeek HA, Mooi WJ, Hilgers FJM, et al. Ploidy status and the response of T1 glottic carcinoma to radiotherapy. *Clin. Otolaryngol.* 1993; 18: 98-101.
- Wiernik G, Millard PR, Haybitte JL: The predictive value of histological classification into degrees of differentiation of squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx compared with the survival of patients. *Histopathology* 1991; 19: 411-417.
- Wigle JT, Harvey N, Detmar M, et al. An essential role for Prox-1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 2002; 21: 1505-1513.
- Wigle JT, Oliver G. Prox 1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell.* 1999; 98: 769-778.
- Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, et al. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2001; 93: 1638-1643.
- Wilting J, Neeff H, Christ B. Embryonic lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res.* 1999; 297(1): 1-11.

- Wilting J, Schneider M, Papoutsis M, et al. An avian model for studies of embryonic lymphangiogenesis. *Lymphology* 2000; 33(3): 81-94
- Witte MH, et al. Lymphangiogenesis: Mechanisms, significance and clinical implications. In *Regulation of angiogenesis*; JD Goldberg, and EM Rosen, eds. (Basel, Birkhäuser Verlag), pp. 65-112.
- Wolf GT, Fisher SG, Truelson JM, et al. DNA content and regional metastases in patients with advanced laryngeal squamous carcinoma. *Laryngoscope* 1994; 104: 479-483.
- Yang W, Klos K, Yang Y, et al. ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2855-2861.
- Yokoyama Y, Sato S, Futagami M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and its receptors in endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2000; 77: 413-418.
- Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, et al. Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 1823-1829.
- Yonemura Y, Fushida S, Bando E, et al. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer. *Eur. J. Cancer* 2001; 37: 918-923.
- Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002; 129: 4797-4806.

